

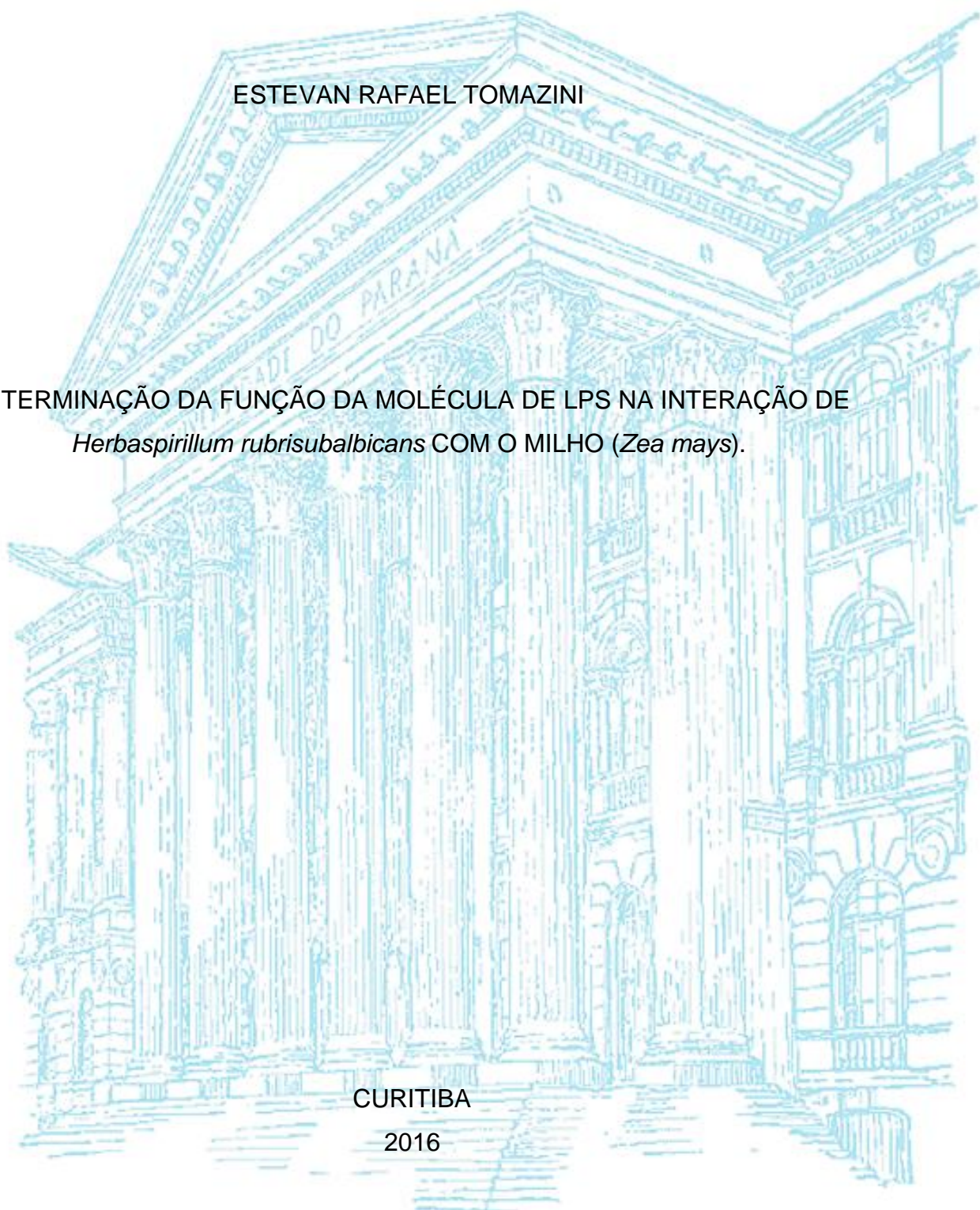
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS - BIOQUÍMICA

ESTEVAN RAFAEL TOMAZINI

DETERMINAÇÃO DA FUNÇÃO DA MOLÉCULA DE LPS NA INTERAÇÃO DE  
*Herbaspirillum rubrisubalbicans* COM O MILHO (*Zea mays*).

CURITIBA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS - BIOQUÍMICA

ESTEVAN RAFAEL TOMAZINI

DETERMINAÇÃO DA FUNÇÃO DA MOLÉCULA DE LPS NA INTERAÇÃO DE  
*Herbaspirillum rubrisubalbicans* COM O MILHO (*Zea mays*).

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Dra. Rose Adele Monteiro  
Co-Orientador: Dr. Eduardo Balsanelli  
Co-Orientador: Dr. Emanuel Maltempi de Souza  
Colaborador: Dr. Rodrigo Vassoler Serrato

CURITIBA  
2016

## TERMO DE APROVAÇÃO

ESTEVAM RAFAEL TOMAZINI

DETERMINAÇÃO DA FUNÇÃO DA MOLÉCULA DE LPS NA INTERAÇÃO DE  
*Herbaspirillum rubrisubalbicans* COM O MILHO (*Zea mays*)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre  
no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



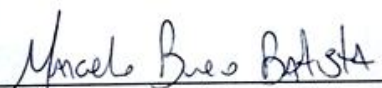
---

Prof.ª Dr.ª Rose Adele Monteiro – Orientadora  
Departamento de Bioquímica, UFPR



---

Prof. Dr. Glaucio Valdameri  
Departamento de Análises Clínicas, UFPR



---

Dr. Marcelo Bueno Batista  
Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 16 de março de 2016.

"A mente é o limite. Enquanto ela pode imaginar que você pode fazer algo, você pode fazê-lo, desde que realmente acredite 100 por cento nisto."

*-Arnold Schwarzenegger-*

Agradeço especialmente à minha orientadora, Rose Adele Monteiro, que me deu a possibilidade de trabalhar no Núcleo de Fixação de nitrogênio nesses últimos 6 anos, além da orientação e interesse pelo trabalho.

Agradeço aos meus Co-orientadores, Eduardo Balsanelli e Emanuel Maltempi de Souza, pelo suporte e sugestões dadas o percurso.

Ao professor Rodrigo Vassoler Serrato pelo auxílio dado a esse trabalho.

Aos colegas, principalmente Manuel Piñero pela amizade.

Aos professores e técnicos envolvidos no projeto.

Ao ex-aluno Matheus Passos pela amizade e descontração.

Ao grande amigo Sr. Fernando Kruegger pelas piadas.

À CAPES pelo auxílio financeiro

## SUMARIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	14
2.1 GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> Spp.....	14
2.1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> .....	15
2.2 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.....	16
2.3 LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS) .....	17
2.4 ANÁLISES <i>in silico</i> DA VIA DE BIOSÍNTESE DE LPS EM <i>H. rubrisubalbicans</i> ...	20
2.4.1 Operon <i>rmlABCD</i> na biossíntese de ramnose .....	21
2.4.2 Gene <i>waaL</i> e a ancoragem da molécula de LPS.....	23
2.4.3 Gene <i>wecB</i> e algumas consequências de sua mutagênese.....	24
3 OBJETIVOS .....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
4.1 BACTÉRIAS .....	26
4.2 PLASMÍDEOS.....	26
4.3 CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO.....	27
4.4 ANTIBIÓTICOS.....	28
4.5 PRIMERS UTILIZADOS NESTE TRABALHO .....	28
4.6 MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS .....	29
4.7 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR .....	29
4.7.1 Extração de DNA genômico.....	29
4.7.2 Extração e purificação de DNA plasmidial .....	30

4.7.3	Eletroforese em gel de agarose .....	30
4.7.4	Restrição do DNA.....	31
4.7.5	Ligação de fragmentos de DNA .....	31
4.7.6	Amplificação do DNA .....	31
4.7.7	Sequenciamento de DNA.....	32
4.8	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	33
4.8.1	Transformação bacteriana utilizando células quimiocompetentes (CHUNG <i>et al.</i> , 1989) .....	33
4.8.2	Transformação bacteriana utilizando células eletrocompetentes (DOWER <i>et al.</i> , 1990) .....	33
4.9	MÉTODOS DE EXTRAÇÕES DO LPS.....	34
4.9.1	Extração rápida de LPS para verificação de fenótipo por SDS-PAGE .....	34
4.9.2	Extração de LPS utilizando o método proposto por MAROLDA <i>et al.</i> , 2006....	34
4.9.3	Extração alternativa para LPS insolúvel na fase aquosa.....	35
4.10	ENSAIOS <i>IN PLANTA</i> .....	36
4.10.1	Desinfecção das sementes de milho e sorgo .....	36
4.10.2	Plantio de milho e sorgo .....	36
4.10.3	Inoculação das plântulas de milho e sorgo .....	36
4.10.4	Ensaio de adesão, colonização epifítica e endofítica de plântulas de milho ..	37
4.10.5	Ensaio de competição epifítica.....	38
4.10.6	Ensaio de adesão a raiz de milho na presença de proteinase K.....	38
4.10.7	Determinação da capacidade das estirpes mutantes de <i>H. rubrisubalbicans</i> em causar a doença da estria vermelha em cultivar susceptível de <i>Sorghum bicolor</i> .....	39
4.11	ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE BIOFILME ATRAVÉS DA FIBRA DE VIDRO .....	39
4.12	RESISTÊNCIA A ESTRESSE QUÍMICO .....	40
4.12.1	Curva de crescimento das estirpes de <i>H. rubrisubalbicans</i> na presença de SDS e AS. 40	
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
5.1	OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA .....	41

5.2	MUTAÇÕES NOS GENES <i>rmlB</i> , <i>waaL</i> e <i>wecB</i> ALTERAM A MOLECULA DE LPS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> .....	44
5.3	AS MUTAÇÕES NOS GENES <i>rmlB</i> , <i>waaL</i> e <i>wecB</i> NÃO CAUSAM UMA DIMINUIÇÃO NO CRESCIMENTO DAS ESTIRPES MUTANTES EM RELAÇÃO A ESTIRPE SELVAGEM. ....	48
5.4	MUTAÇÕES NOS GENES <i>waaL</i> e <i>wecB</i> DIMINUEM A RESISTÊNCIA DE <i>H. rubrisubalbicans</i> a SDS. ....	49
5.5	MUTAÇÕES NOS GENES <i>rmlB</i> , <i>waaL</i> e <i>wecB</i> DIMINUEM A RESISTÊNCIA DE <i>H. rubrisubalbicans</i> AO ÁCIDO SALICILICO.....	50
5.6	MUTAÇÕES NOS GENES <i>rmlB</i> , <i>waaL</i> e <i>wecB</i> não alteram a capacidade do <i>H. rubrisubalbicans</i> de colonizar epifiticamente e endofiticamente as raízes de milho. ....	52
5.7	AS ESTIRPES <i>waaL</i> e <i>wecB</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> SÃO MENOS COMPETITIVAS QUE A ESTIRPE SELVAGEM M1 EM COLONIZAR EPIFITICAMENTE RAÍZES DE MILHO.....	54
5.8	A PRODUÇÃO DE BIOFILME, EM MATRIZ INERTE, DO MUTANTE <i>wecB</i> É MENOR QUE A PRODUÇÃO DE BIOFILME DA ESTIRPE SELVAGEM M1 .....	59
5.9	ENVOLVIMENTO DO LPS NA FORMAÇÃO DA ESTRIA VERMELHA EM ESTIRPES SUCEPTIVEIS DE SORGO .....	61
6	CONCLUSÕES.....	63
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
	<b>ANEXOS</b> .....	73



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE LPS.....	18
FIGURA 2: ANÁLISE <i>in silico</i> MOSTRANDO OS GENES ENVOLVIDOS NA BIOSSÍNTESE DE LPS EM <i>H. rubrisubalbicans</i> .....	20
FIGURA 3: VIA DE SÍNTESE DE D-RAMNOSE PELO OPERON <i>rmlABCD</i> .....	22
FIGURA 4: ESQUEMA DE PLANTIO HIDROPÔNICO E INÓCULO EM TUBO DE ENSAIO. ....	37
FIGURA 5: ESQUEMA DOS ENSAIOS DE ADESÃO, COLONIZAÇÕES EPIFÍTICA E ENDOFÍTICA.....	38
FIGURA 6: ESQUEMA DE CLONAGEM. ....	42
FIGURA 7: RESTRIÇÃO DO VETOR pSUP202 .....	43
FIGURA 8: CONFIRMAÇÃO DOS MUTANTES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> .....	44
FIGURA 9: PERFIL DE LPS DOS MUTANTES DOS GENES <i>rmlB</i> , <i>wecB</i> E <i>waaL</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> .....	45
FIGURA 10: PERFIL DE LPS DA ESTIRPE SELVAGEM DE M1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES .....	46
FIGURA 11: PERFIL DE LPS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E SEUS MUTANTES E CONTROLE PURIFICADOS POR EXTRAÇÃO ORGÂNICA EM FENOL OU BUTANOL (SmR1).....	47
FIGURA 12: CURVA DE CRESCIMENTO CONTROLE COM A ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E SEUS MUTANTES.....	48
FIGURA 14: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E SEUS MUTANTES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO .....	51
FIGURA 15: PERFIL DE ADESÃO, COLONIZAÇÃO EPIFÍTICA E COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E SEUS MUTANTES EM MILHO ( <i>Zea       mays</i> VARIEDADE F3053) .....	53
FIGURA 16: PERFIL DE COMPETIÇÃO NA ADESÃO ENTRE <i>H. rubrisubalbicans</i> E SEUS MUTANTES. ....	55
FIGURA 17: PERFIL DE COMPETIÇÃO EPIFÍTICA ENTRE <i>H. rubrisubalbicans</i> E SEUS MUTANTES .....	56

FIGURA 20: PERFIL DE COMPETIÇÃO DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E SEUS MUTANTES CONTRA LPS PURIFICADO DE <i>H. seropedicae</i> .....	59
FIGURA 21: PRODUÇÃO RELATIVA DE BIOFILME .....	60
FIGURA 22: FORMAÇÃO DA DOENÇA DA ESTRIA VERMELHA EM ESTIRPE SUCEPTIVEL DE SORGO ( <i>Sorghum bicolor</i> ) .....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA1: CHAVE TAXONOMICA DO GENERO <i>Herbaspirillum</i> .....	14
TABELA 2: MEMBROS DO GENERO <i>Herbaspirillum spp.</i> .....	15
TABELA 3: ESTIRPES E MUTANTES UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	26
TABELA 4: PLASMIDIOS UTILIZADOS E CONSTRUIDOS NESTE TRABALHO....	27
TABELA 5: PREPARO DE ESTOQUES E CONCENTRAÇÕES USUAIS DOS ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NESTRE TRABALHO.....	28
TABELA 6: LISTA DE PRIMERS UTILIZADOS NESSE TRABALHO.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AS - ácido salicílico

ATP - 5' trifosfato de adenosina

D.O. - Densidade ótica

DMSO - dimetilssulfoxido

DNA - Do inglês "*deoxyribunocleic acid*"

ECA - Do ingles "*Enterobacterial common antigen*"

EDTA - Ácido etilenodiamino-tetra-acético

GlcN - N-acetil glicosamina

kb - Quilopares de base

ManNAc - N-acetilmanosamina

NAD - Do inglês "*dicotinamide adenine dinucleotide*"

Nal - Ácido nalidíxico

pb - Pares de base nucleotídeos

PEG - polietilenoglicol

Pi - Fosfato inorgânico

RNA - Do inglês "*ribonucleic acid*"

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecilsulfato de sódio

Sm - Estreptomicina

Tc - Tetraciclina

Tris - (hidroximetil)-aminometano

TSS - Do inglês "*transformation and storage solution*"

UDP - Uridila difosfato

## RESUMO

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* são capazes de se associar com as principais monoculturas do ponto de vista econômico (trigo, milho, arroz e a cana-de-açúcar). Essa associação pode ser benéfica, através da estimulação da liberação de fitormônios pela planta e pela fixação biológica de nitrogênio realizada pela bactéria, que tem a capacidade de diminuir a demanda por fertilizantes nitrogenados, grandes poluidores de afluentes. Uma adesão eficiente é essencial para que a interação planta-bactéria, os lipopolissacarídeos (LPS) são moléculas volumosas e anfipáticas, presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas, muitas vezes importantes para a adesão a diferentes superfícies, como nas raízes de plantas, e na resistência ambiental frente a substâncias tóxicas. O LPS conta com uma porção conservada, o antígeno comum enterobacteriano (ECA) e uma porção extremamente diversificada (O-antígeno), reconhecido como fator de patogenicidade em diversas bactérias. Buscando compreender a importância do LPS na interação planta-*Herbaspirillum rubrisubalbicans*, nesse trabalho foram construídos 3 mutantes para genes relacionados a biossíntese da molécula de LPS em *H. rubrisubalbicans* (*rmlB*, *waaL* e *wecB*) e foram conduzidos experimentos para determinar o perfil da molécula de LPS, perfil de colonização da raiz de milho e perfil de competição durante a adesão a raiz do milho, perfil de sensibilidade frente ao SDS e ao ácido salicílico, produção de biofilme e capacidade de gerar doença em cultivar suscetível de sorgo. Nossos resultados mostram que esses genes estão relacionados com a formação do LPS íntegro e que embora a estrutura dessa molécula não tenha sido essencial para a colonização da raiz de milho e na formação da doença da estria vermelha no sorgo, ela foi essencial frente ao aparecimento abrupto de substâncias tóxicas e na manutenção da competitividade na rizosfera, principalmente no mutante do gene *wecB*, que também apresentou deficiência na produção de biofilme.

Palavras-chave: *Herbaspirillum*, interação planta-bactéria, LPS.

## ABSTRACT

Bacterias from the genus *Herbaspirillum* are able to associate with the main monocultures from an economic point of view (wheat, corn, rice and sugarcane). This association may be beneficial, stimulating the release of phytohormones by the plant and through biological nitrogen fixation performed by the bacterium, which is able to reduce the demand for nitrogen fertilizers, great polluters of rivers. An efficient adhesion is essential for the plant-bacteria interaction, lipopolysaccharide (LPS) are bulky and amphipathic molecules present in the outer membrane of Gram-negative bacteria often important in adhesion to different surfaces such as the roots of plants, and environmental resistance against toxic substances. The LPS has a conserved portion, the enterobacterial common antigen (ECA) and an extremely diverse portion (O-antigen), recognized as a pathogenic factor in various bacteria. In order to evaluate the importance of LPS in the plant-*Herbaspirillum rubrisubalbicans* interaction, in this study were constructed 3 mutant of genes related in the biosynthesis of the LPS molecule in *H. rubrisubalbicans* (*rmlB*, *Waal* and *wecB*) and experiments were conducted to determine LPS molecule profile, colonization profile to the corn roots and competition profile during adhesion, susceptibility profile against SDS and salicylic acid, biofilm production and ability to produce the red stripe disease in susceptible cultivar of sorghum. Our results show that these genes are related to the formation of an intact LPS and that although the structure of this molecule was not essential in the colonization of corn roots and the formation of red stripe disease in sorghum, it was essential to oppose the abrupt onset of toxic substances and maintaining competitiveness in the rhizosphere, especially in the *wecB* gene mutant, which also showed deficiency in the biofilm production.

Keywords: *Herbaspirillum*, plant-bacteria interaction, LPS.

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos na atualidade tem feito necessário o aumento da produção agrícola, a utilização das bactérias promotoras de crescimento vegetal, como biofertilizante, é uma saída, evitando os danos causados ao meio ambiente. Uma Interação eficiente entre a planta e a bactéria deve ocorrer para que a promoção do crescimento ocorra. A colonização da planta pela bactéria depende de diversos fatores, dentre eles exopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS). Desta forma, a compreensão dos mecanismos de colonização é indispensável para a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal na agricultura.

Nitrogênio e fósforo são considerados os principais nutrientes que limitam o crescimento vegetal (SCHMID, 2006; PEÑUELAS *et al.*, 2012; ÅGREN *et al.*, 2012). Baixas concentrações de nitrogênio levam a um crescimento diminuído das partes superiores do vegetal, que deposita matéria seca na raiz para garantir sua sobrevivência, diminuindo a produtividade em vegetais de interesse econômico. Estima-se que entre 40 e 60% do total da produção se dá pelo efeito direto de fertilizantes (STEWART *et al.*, 2005). A concentração de nitrogênio deve ser suficiente para que ele consiga ser transportado da raiz (alta concentração) até as porções sob crescimento primário (ERICSSON *et al.*, 1995). Esse problema é contornado com a suplementação do solo com adubos nitrogenados, principalmente nitrato de amônio e ureia, porém a utilização dos mesmos pode ser deletéria para o meio ambiente (CAMARGO & ALONSO, 2006).

Uma maneira de minimizar o efeito ambiental é a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal, dentre elas, bactérias fixadoras de nitrogênio como as pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*. Essas bactérias são endofíticas, gram-negativas capazes de se associar à raízes de plantas e fixar nitrogênio atmosférico em condições microaeróbias (BALDANI *et al.*, 1986a; SCHMID *et al.*, 2006). As bactérias do gênero *Herbaspirillum* se associam principalmente à gramíneas, tais quais o arroz, milho, trigo, sorgo, cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1986b), bananeira e abacaxizeiro (CRUZ *et al.*, 2001) todos vegetais de relevância econômica. Essas culturas isoladamente contam com 35% da demanda mundial por

fertilizantes (4,5 milhões de toneladas em 2013), com 53% desse total referente apenas a fertilizantes nitrogenados (FUNDAÇÃO VALE, 2013), demonstrando o enorme potencial econômico e ambiental dos bioinoculantes.

*Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1, um diazotrofo endofítico, que é uma bactéria promotora de crescimento vegetal, mas apresenta um fenótipo diferente quando inoculado na variedade de cana de açúcar B-4362 e em variedades de sorgo. Esta bactéria causa a doença da estria mosqueada em cana-de-açúcar e da estria vermelha em variedades susceptíveis de sorgo.

Como *H. rubrisubalbicans* também pode promover o crescimento vegetal de cana de açúcar (OLIVEIRA *et al.*, 2006) é necessário definir por que, em determinadas variedades, *H. rubrisubalbicans* M1 age como fitopatógeno. Alguns fatores diferenciais já foram apontados durante a comparação com *H. seropedicae* – espécie filogeneticamente relacionada e não patogênica - como a presença de um cluster de biossíntese de celulose e de proteínas relacionadas ao sistema de secreção do tipo III por *H. rubrisubalbicans* M1. O estudo de alguns destes fatores, como a biossíntese de celulose, mostrou-se importante para os processos de adesão, formação de biofilme e patogenicidade por *H. rubrisubalbicans* M1 (MONTEIRO *et al.*, 2012; TULESKI, 2013).

Diante dos dados disponíveis, podemos sugerir que vários fatores, ainda desconhecidos, podem também estar relacionados com os processos de patogenicidade. A elucidação destes fatores nos levará a entender como ocorre o desenvolvimento dos sintomas da doença e porque essa interação é espécie-específica.

Em *H. seropedicae* a molécula de LPS é um fator importante para o processo de colonização (BALSANELLI *et al.*, 2010 e BALSANELLI *et al.*, 2013), esse trabalho tem como objetivo determinar se o LPS de *H. rubrisubalbicans* também está envolvido nesse processo.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 GENERO *Herbaspirillum* Spp.

O primeiro membro descrito do gênero *Herbaspirillum*, o *Herbaspirillum seropedicae*, foi descrito por BALDANI e colaboradores em 1986 na cidade de seropédica, no Rio de Janeiro. Inicialmente classificado como uma bactéria do gênero *Pseudomonas* e posteriormente alocado em seu próprio gênero (BALDANI *et al.*, 1996a). A chave taxonômica segue como mostrado na TABELA 1, segundo “the catalogue of life”.

Taxonomia do genero <i>Herbaspirillum</i>	
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Betaproteobacteria</i>
Ordem	<i>Burkholderiales</i>
Familia	<i>Oxalobacteriaceae</i>
Genero	<i>Herbaspirillum</i>
Espécie	<i>Herbaspirillum spp</i>

TABELA 1: CHAVE TAXONOMICA DO GENERO HERBASPIRILLUM. Retirados do “the catalogue of life” <<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/4259842>>.

Atualmente o gênero conta com 15 espécies (TABELA 2), entre elas o *H.rubrisubalbicans* estirpe M1, principal alvo de estudo contido nesse trabalho.

ESPÉCIE	REFERÊNCIA
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	BALDANI <i>et al.</i> , 1996
<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	VALVERDE <i>et al.</i> , 2003
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	KIRCHHOF <i>et al.</i> , 2001
<i>Herbaspirillum huttiense huttiense</i>	DING & YOKOTA, 2004
<i>Herbaspirillum huttiense Putei</i>	DING & YOKOTA, 2004
<i>Herbaspirillum hiltneri</i>	ROTHBALLER <i>et al.</i> , 2006
<i>Herbaspirillum chlorophonolicum</i>	IM <i>et al.</i> , 2004
<i>Herbaspirillum rizhosphaerae</i>	JUNG <i>et al.</i> , 2007
<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	DING & YOKOTA, 2004
<i>Herbaspirillum aquaticum</i>	DOBRITSA <i>et al.</i> , 2010

<i>Herbaspirillum aurantiacum</i>	CARRO <i>et al.</i> , 2012
<i>Herbaspirillum canariense</i>	CARRO <i>et al.</i> , 2012
<i>Herbaspirillum soli</i>	CARRO <i>et al.</i> , 2012
<i>Herbaspirillum psychrotolerans</i>	BAJERSKI <i>et al.</i> , 2013

TABELA 2: MEMBROS DO GENERO *Herbaspirillum* spp.

Essas bactérias são bastonetes Gram-negativos estritamente aeróbios, podendo se desenvolver em atmosferas microaeróbicas. Apresentam mobilidade, contendo um ou mais flagelos, podendo se apresentar em ambos os polos da célula. São capazes de utilizar diversas fontes de carbono com preferência para ácidos orgânicos como malato e lactato. Seu crescimento otimizado corre em torno de 30°C (BALDANI *et al.*, 1986a; SCHIMIT *et al.*, 2006).

Esse gênero é comumente encontrado em diversos ambientes associado a diversos vegetais. Alguns foram isolados associados a raízes de vegetais (*H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*) e estruturas aéreas (*H. rhizospherae* e *H. frisingense*). Também foram encontrados em água doce de poços (*H. huttiense huttiense*, *H. huttiense puttei* e *H. autotrophicum*) e especificamente no solo das ilhas canarieas (*H. aurantiacum*, *H. canariense* e *H. soli*). Recentemente uma espécie foi encontrada ao leste da antártica (*Herbaspirillum psychrotolerans*).

#### 2.1.1 *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Essas bactérias são as duas espécies mais bem estudadas do gênero, principalmente *H. seropedicae*. O potencial como inoculante já foi avaliado previamente, onde foi observado que plantas de arroz inoculadas com a estirpe Z67 obtiveram um aumento de até 50% do peso seco da planta e um considerável aumento do nitrogênio contido no grão (BALDANI *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 2002).

Já foram observados diversos canaviais no Brasil sendo cultivados por mais de um século sem a necessidade de adubação, indicando que a fixação de nitrogênio foi essencial para o desenvolvimento dessa cultura, principalmente pelas bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (DOBEREINER, 1992). Estes dados sugerem que o *H. seropedicae* tem grande

potencial como biofertilizante nitrogenado, além de estimular o desenvolvimento das plantas pela produção de fitohormônios (OLIVARES *et al.*, 1997).

*H. rubrisubalbicans* foi descrito pela primeira vez por Christopher & Edgerton, (1932) como o causador da doença da estria mosqueada em cultivares de cana-de-açúcar e por Hale & Wilkie (1972) como o causador da doença da estria vermelha em sorgo. Apenas em 1996 que essa bactéria foi transferida para do gênero *Pseudomonas* para o gênero *Herbaspirillum* (BALDANI *et al.*, 1996). Embora seja geneticamente a bactéria mais próxima ao *H. seropedicae*, essa bactéria se apresenta como um patógeno vegetal leve, enquanto *H. seropedicae* não é capaz de gerar doença associado à planta.

## 2.2 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

A rizosfera conta com um elevado número de microrganismos de diversas espécies interagindo com a planta, seja de forma benéfica como de forma patogênica. As bactérias associativas estão presentes na maioria das espécies de planta, vivendo de modo latente ou ativo, colonizando tecidos específicos ou a planta toda. Podemos classificá-las dividindo em dois grupos: as epifíticas (que estão presente na superfície da planta) e as endofíticas (que podem ser isoladas do interior da planta) (HALLMANN *et al.*, 1997).

Algumas bactérias endofíticas adentram a epiderme radicular através de enzimas hidrolíticas como celulasas e pectinases (HALLMANN *et al.*, 1997).

Em *H. seropedicae* a colonização ocorre de maneira não invasiva, através de reentrâncias e descontinuidades na epiderme radicular (MONTEIRO *et al.*, 2012). Estudos realizados por Olivares e colaboradores (1996) concluíram que a infecção por *Herbaspirillum* spp. ocorre através da ligação da bactéria à superfície da planta, seguido de proliferação preferencialmente nas raízes secundárias e ferimentos, penetração e espalhamento da bactéria através dos espaços intercelulares e feixes vasculares das partes aéreas com subsequente colonização e estabelecimento nos vasos do xilema.

Em *H. rubrisubalbicans* o mecanismo parece ser diferente, em trabalho conduzido por Tuleski e colaboradores, foi observada a presença de 8 genes

relacionadas com a via de síntese e degradação da celulose (genes *wss*) na estirpe M1, podendo ser umas das razões da patogenicidade de *H. rubrisubalbicans*.

Um ponto interessante a ser discutido é o fato de *H. rubrisubalbicans* produzir uma quantidade visivelmente superior de muco em relação a *H. seropedicae*, possivelmente EPS (JAMES *et al.*, 1997), podendo ser um fator importante na adesão e competição superior dessa bactéria.

### 2.3 LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS)

Observadas pela primeira vez por esforços de Luderitz and Westphal (1954), os LPS são macromoléculas ancoradas à membrana externa de bactérias gram-negativas (COLLINS & FERRIER, 1995). O LPS é formado por três regiões: o lipídeo-A, o núcleo oligossacarídico e o antígeno-O (SUTHERLAND, 1985). A formação do lipídeo-A e o O-antígeno iniciam na membrana interna em processos separados, são transportados para o espaço periplasmático, montados e transportados para a membrana externa na forma de LPS íntegro. O lipídeo-A é a estrutura de ancoragem, irá conter toda a porção carboidrato do lipopolissacarídeo ligado à membrana externa da bactéria (RIETSCHEL *et al.*, 1994). A ligação entre o lipídeo-A e o núcleo oligossacarídico é dependente de duas moléculas do ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (Kdo), ligado ao C-6 livre de uma das N-acetilglicosaminas (RAETZ & WHITFIELD, 2002). O núcleo pode ser dividido em núcleo interno, composto por duas moléculas de Kdo e heptoses, e em núcleo externo, composto de hexoses piranosídicas, estas estruturas são muito bem conservadas e contêm carboidratos exclusivos às bactérias, como heptoses e manose (RAETZ, 1990). O O-antígeno corresponde a porção com variabilidade interespecífica, sendo comumente formada por unidades oligossacarídicas repetitivas, onde diferentes níveis de polimerização produzem cadeias com massas moleculares diferentes, também denominadas como estruturas truncadas, fenômeno que confere o padrão de bandas na análise eletroforética características de LPS (ERRIDGE *et al.*, 2002). Essas cadeias polissacarídicas extremamente variadas serão responsáveis pelo 1º contato da bactéria com o ambiente, sendo a 1ª linha de

defesa contra o estresse ambiental e também no reconhecimento e adesão à lectinas e consequente adesão hospedeiro-bactéria.

A FIGURA 1 mostra esquematicamente a estrutura do lipídio A, as porções observadas no LPS e um esquema da formação da molécula:

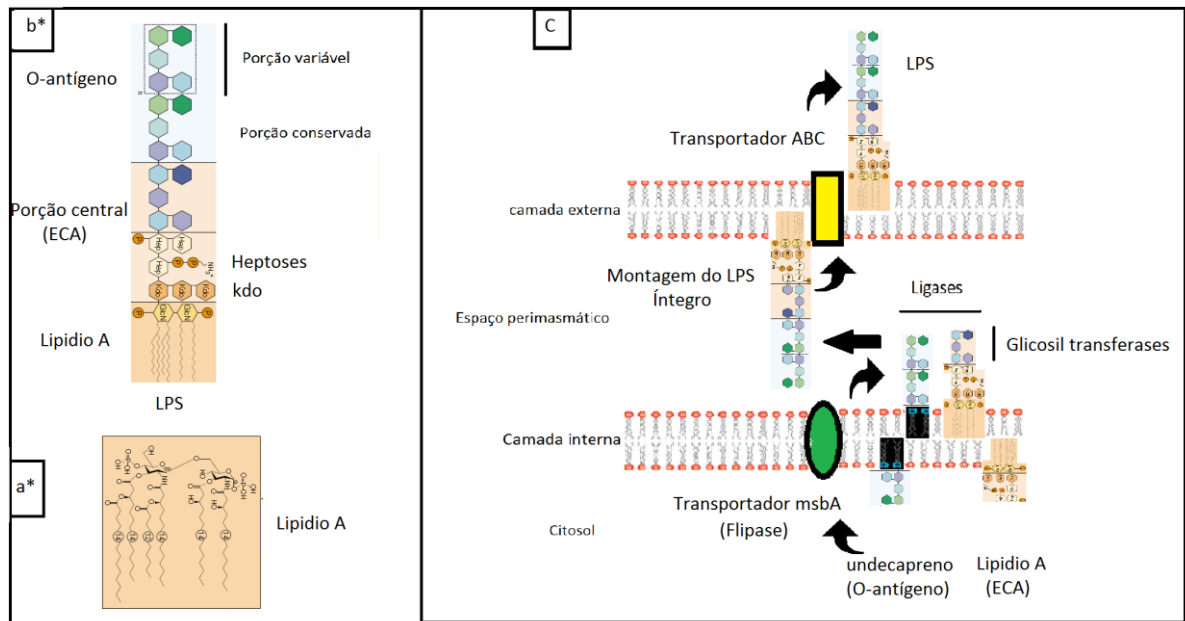


FIGURA 1: ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE LPS.. (a)- mostra a estrutura do lipídio A, estrutura formada a partir da condensação entre 2 moléculas de n-acetilglicosamina ligadas à ácido graxos no citosol, (b) essa molécula será ligada com 2 ou 3 moléculas de kdo e posteriormente às heptoses, será transferida para o espaço periplasmático onde sofrerá alongação de cadeia, formando o ECA e formará o LPS íntegro com a ligação da porção O-antígeno a ela. A porção O-antígeno é montada separadamente no citosol, carregada por um ácido graxo de 52c (undecapreno fosfato), também é transportada ao espaço periplasmático e alongada. A molécula completa do LPS é então transportada via transportador ABC para camada externa da membrana celular. O esquema é mostrado como (c) na figura acima. Adaptado de RAETZ & WHITFIELD, 2002 e BEUTLER & RITSCHEL, 2003).

O LPS representa cerca de 5% do peso seco de uma bactéria gram-negativa. Esse volume celular unido a característica anfipática do LPS impõe uma grande importância na interação com o microambiente e na competição direta com outros microrganismos (MORRISON, 1975).

O LPS é um dos principais responsáveis na adesão de bactérias a diversas superfícies, faz o reconhecimento de células vegetais e animais através do O-antígeno, diretamente responsável pela virulência de diversas espécies de bactérias. A ramnose é um monossacarídeo comumente associado à adesão e virulência de

diversos gêneros e espécies bacterianas (COLEMAN *et al.*, 1979; JIANG *et al.*, 1991; McPHERSON *et al.*, 1994; TOMIHISA *et al.*, 1999; CHIANG *et al.*, 1999 e WEI *et al.*, 2006)

A perda ou alteração da estrutura do O-antígeno está relacionada com a perda da virulência em *Pseudomonas syringae* (SMITH *et al.*, 1994) e com a diminuição da colonização de plantas de batata por *Pseudomonas putida* (WEGER *et al.*, 1989). Durante a simbiose com rizóbios a nodulação de leguminosas foi alterada na ausência de LPS intactos (CARLSON *et al.*, 1995; MAAGD *et al.*, 1998). Estirpes mutantes de Rizóbios na produção de LPS permanecem nos cordões de infecção, sem chegar ao estado de bacteróides fixadores de nitrogênio (NOEL *et al.*, 1986), não ocorrendo o desenvolvimento completo dos nódulos em diversos legumes (NOEL *et al.*, 1986; CAMPBELL *et al.*, 2002; BROUGHTON *et al.*, 2006). Mutantes de *R. etli* que possuem um LPS truncado formam nódulos defeituosos e não fixam nitrogênio (NOEL & DUELLI, 2000).

Estirpes mutantes de *H. seropedicae* SmR1 nos genes *rmlB* e *rmlC* (sinonímia *rfbB* e *rfbC*), envolvidos na biossíntese de ramnose apresentaram uma alteração drástica na composição e estrutura do LPS de *H. seropedicae* SmR1, o que causou a diminuição da capacidade de adesão e colonização endofítica desta bactéria (BALSANELLI *et al.*, 2010). A estirpe mutante *waaL* de *H. seropedicae* SmR1 produziu um LPS sem a porção de O-antígeno do LPS, e foi deficiente na colonização (BALSANELLI *et al.*, 2014). Balsanelli e colaboradores em 2014 também sugeriram que o *H. seropedicae* usa o LPS para aderir em receptores proteicos vegetais possivelmente pelo reconhecimento e ligação a lectinas.

A partir de análises *in silico* realizadas previamente a este trabalho (FIGURA 2), foram construídas três estirpes mutantes de *H. rubrisubalbicans* em genes envolvidos com a biossíntese de LPS com o objetivo de demonstrar o papel do LPS na interação entre o *H. rubrisubalbicans* e a planta.

## 2.4 ANÁLISES *in silico* DA VIA DE BIOSSÍNTESE DE LPS EM *H. rubrisubalbicans*

A análise *in silico* buscando por genes relacionados com a biossíntese de LPS em *H. seropedicae* foi conduzida por BALSANELLI e colaboradores (2012) buscando similaridades contra diversos genomas descritos na literatura para bactérias produtoras de LPS. A partir de seus resultados, foi feita uma comparação dos genomas de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, buscando por similaridades em genes da via de biossíntese de LPS em *H. rubrisubalbicans* (FIGURA 2).

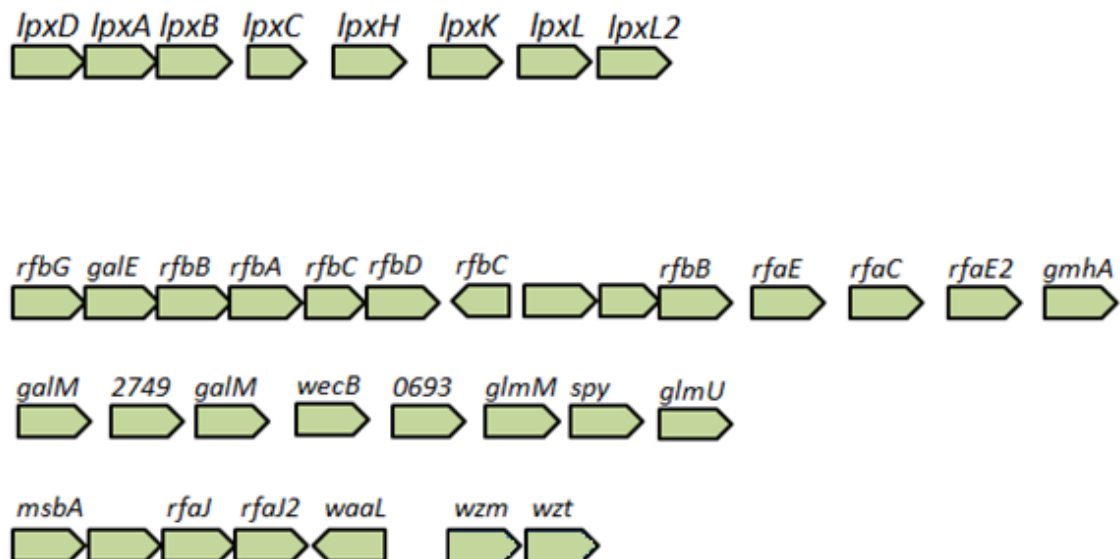


FIGURA 2: ANÁLISE *in silico* MOSTRANDO OS GENES ENVOLVIDOS NA BIOSSÍNTESE DE LPS EM *H. rubrisubalbicans*. O operon LPX é responsável pela biossíntese do lipídio A, que será a base de sustentação da porção carboidrato. As 2ª e 3ª linhas mostram enzimas responsáveis pela síntese e modificação dos monossacarídeos. A última linha mostra os genes que codificam para transportadores e ligases, sendo a proteína msbA o transportador citossólico e o operon wz é responsável pela codificação do transportador ABC na membrana externa da célula.

Os resultados dessas análises mostram genes relacionados com a biossíntese de LPS agrupados em operons. O operon *lpx* está relacionado com a biossíntese do lipídio-A, esse processo se inicia com o produto do gene *lpxA*, que irá ligar uma molécula de ácido graxo à UDP-N-acetilglucosamina, que será desacetilada pela proteína LpxC, essencial para a ancoragem na membrana externa da bactéria. LpxD faz a acilação da molécula gerando UDP-2,3-diacilglucosamina e

LpxH fosforila a molécula à 2,3-diacilglicosamina-1-fosfato (lipídio X) e Uridila monofosfato. A proteína LpxB condensa o lipídio X com seu precursor UDP-2,3-diacilglicosamina formando o precursor do lipídio A. A molécula de lipídio A é finalizada por LpxK, que utiliza uma molécula de ATP para fosforilar a posição 4' da porção dissacarídeo, gerando o lipídio-A. O produto do gene *waaA* está relacionado com a transferência do kdo para o lipídio-A. O kdo-lipídio-A pode receber grupamentos lauril (*lpxL*) e grupamentos meristil (*lpxM*). Essa molécula de lipídio-A será transferida do citosol para o espaço periplasmático através da lipídeo-A flipase (produto do gene *msbA*) (WILLIAMS *et al.*, 2006).

Na biossíntese do O-antígeno, temos os genes *waa* (sinonímia *rfa*) e *gmh* codificam para glicosiltransferases, responsáveis pela elongação da molécula. Para a diversidade estrutural do LPS contamos ainda com epimerases (genes *gal* e *wec*) e também os genes *rml* (sinonímia *rfb*) da via de biossíntese de ramnose. A construção do O-antígeno acontece separadamente do carboidrato ligado ao lipídio A, inicia através da ligação de uma molécula de UDP-N-acetilglicosamina à uma molécula de undecaprenil fosfato através de *wecA*, etapa inicial da obtenção da porção conservada do O-antígeno. A partir dessas moléculas, no espaço periplasmático, as diferentes glicosiltransferases irão compor o restante do ECA e do O-antígeno. A O-antígeno ligase *waaL* é capaz de retirar a porção carboidrato do undecapreno fosfato e ligá-lo ao lipídeo-A, formando o LPS íntegro (MEIER-DIETER *et al.*, 1992). Genes *wzm* e *wzt* codificam para transportador ABC, que irá transportar o LPS completo para o espaço periplasmático a custos de ATP. O transporte da molécula de LPS do interior do periplasma para a monocamada externa da bactéria é pouco compreendido. A FIGURA 1c exemplifica o processo de montagem.

#### 2.4.1 Operon *rmlABCD* na biossíntese de ramnose

Vários trabalhos mostram a importância da ramnose na composição da porção oligossacarídica em organismos patogênicos: *Salmonella enterica* (JIANG *et al.*, 1991), *Shigella flexneri* (McPHERSON *et al.*, 1994), *Escherichia coli* (COLEMAN *et al.*, 1979), *Salmonella enterica* sorotipo *typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Streptococcus mutans* (TOMIHISA *et al.*, 1999); *Vibrio cholerae* (CHIANG *et al.*,



1999) , *Mycobacterium tuberculosis* (WEI *et al.*, 2006), entre outras bactérias de interesse clínico.

A via de síntese da ramnose é dependente do operon *rmIABCD* e se inicia com a timidililação da glucose-1-fosfato na reação da enzima glucose-1-fosfato timidiltransferase (produto do gene *rmIA*). A próxima etapa, referente ao gene silenciado neste trabalho, consiste na oxidação e consequente desidratação do carbono 4 pela dTDP-glucose-4,6-dehidratase (produto do gene *rmIB*). O gene *rmIC* codifica para a dTDP-6-deoxi-D-xilo-4-hexulose 3,5-epimerase, que catalisa a epimerização dos carbonos C3 e C5 e o último gene do operon, *rmID*, codifica para a enzima dTDP-6-deoxi-L-lixo-4-hexulose redutase que por sua vez catalisa a redução do grupamento cetona no carbono C4, gerando dTDP-L-L-ramnose.

A figura a seguir, retirada de NASMITH & KLEIN mostra o posicionamento simplificado da via dentro da glicólise:

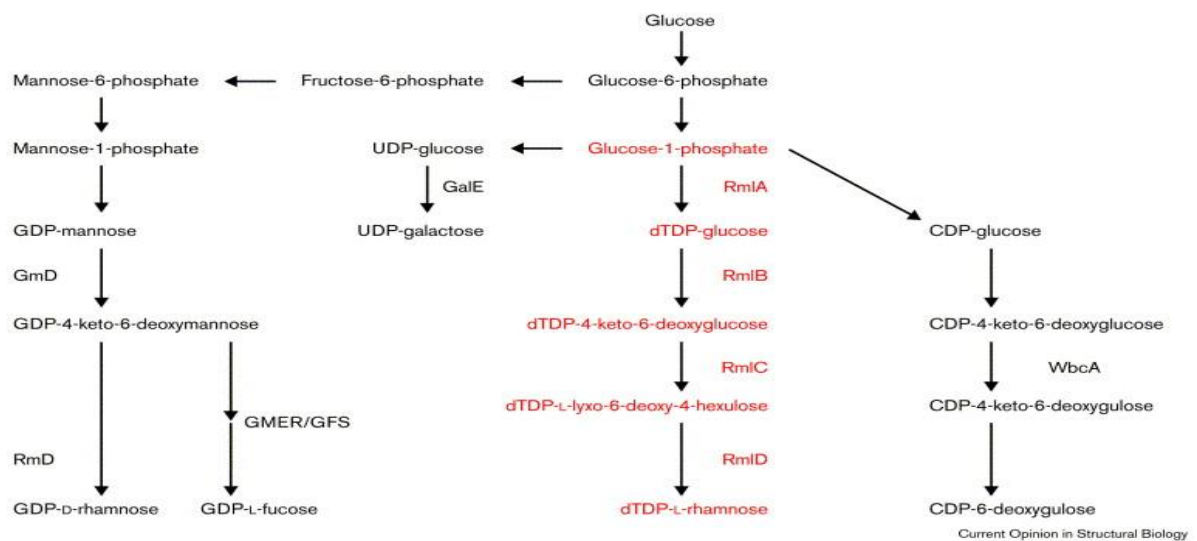


FIGURA 3: VIA DE SÍNTESE DE D-RAMNOSE PELO OPERON *rmIABCD* (retirado de GIRAUD & NAISMITH, 2000)

A via da ramnose é altamente conservada em ambas bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os genes necessários para a montagem do LPS são comumente encontrados em clusters próximos a genes *rfb*, porém em alguns casos esses genes podem estar dispersos pelo genoma, como em *Streptococcus mutans*, onde o gene *rmID* se encontra distante desse cluster.

A ramnose é um dos principais constituintes do LPS da estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* (SERRATO, 2008). A mutação dos genes *rmIB* e *rmIC* em *H. seropedicae* alteraram a composição do LPS, diminuindo a capacidade de

adesão e colonização endofítica por esta bactéria e também mostrou que a deficiência do gene *rmIB* pode diminuir a adesão em até 100 vezes. (BALSANELLI *et al.*, 2010).

Por outro lado, já foi observado alguns casos onde a bactéria apresenta patogenicidade quando operon *rmIABCD* não está sendo expresso, como em estudo de ROBERTSON e colaboradores (1994) com o gênero *Neisseria spp.*

Na biossíntese do LPS, esse operon está presente no espaço periplasmático e é importante na formação da porção de alta variabilidade do O-antígeno (FIGURAS 1 e 2).

#### 2.4.2 Gene *waaL* e a ancoragem da molécula de LPS

O gene *waaL*, que codifica para a o-antígeno polimerase, é responsável pela montagem da porção o-antígeno ao lipídio A (FIGURAS 1). Esse gene foi mutagenizado por ser específico para a presença da porção O-antígeno na molécula de LPS.

Já foi observado que o gene *waaL* de *H. seropedicae* é induzido durante a colonização da rizosfera de milho. A estirpe mutante de *H. seropedicae* no gene *waaL* possui um LPS sem a porção O-antígeno e teve a sua capacidade de colonização epifítica e endofítica prejudicadas. Vale frisar que o LPS de *H. seropedicae* se liga em uma lectina da raiz de milho, através do seu resíduo de N-acetilglucosamina. Esses resultados mostraram que o gene *waaL* é essencial para a montagem correta da molécula de LPS e, conseqüentemente, para uma colonização eficiente em *H. seropedicae*. (BALSANELLI *et al.*, 2013)

Essa abordagem também foi empregada nesse trabalho, visando avaliar se a porção carboidrato da molécula de LPS de *H. rubrisubalbicans* é importante para a interação planta-bactéria.

### 2.4.3 Gene *wecB* e algumas consequências de sua mutagênese

Todas as bactérias produzem polímeros de carboidratos complexos os quais, quando incorporados à parede bacteriana ou envelope, comumente auxiliam na proteção da bactéria contra o ambiente, como o sistema imune de um hospedeiro. Muitos açúcares, como a L-ramnose, não estão presentes em mamíferos superiores e são extremamente conservados em bactérias, mostrando a importância das epimerases (ALLARD *et al.*, 2002).

O gene *wecB*, que codifica para a UDP-N-acetilglicosamina 2-epimerase, catalisa a epimerização de UDP-N-acetilglicosamina para UDP-N-acetilmanosamina. A ausência dessa enzima leva a dois problemas à célula: reconhecimento celular diminuído e estrutura da parede celular é parcialmente perdida.

A N-acetilmanosamina é precursor dos ácidos siálicos, açúcares muito importantes no reconhecimento imunológico e também presente nos sialoglicoconjugados, que podem compor o biofilme bacteriano (KEPLER, 2001).

A formação da parede celular, as bactérias comumente contêm 2 ácidos teicóicos: poliglicerol fosfato (essencial para o crescimento celular) e o poliglicosil N-acetilgalactosamina 1-fosfato (dito não essencial). Essas moléculas são ancoradas ao peptidoglicano por unidades de ligação, como a N-acetilglicosamina e a N-acetilmanosamina. Quando a estrutura se completa, a célula apresentará baixo conteúdo de fosfatos e pode perder o formato de bacilo (SOLDO *et al.*, 2002).

Embora a deleção no gene que codifica para a UDP-N-acetilglicosamina 2-epimerase seja bastante danosa para a célula, quando N-acetilmanosamina 6-fosfato está presente no meio de cultura, a bactéria pode captá-la via sistema fosfotransferases ManXYZ fosfoenol piruvato- dependentes (PTS) (KIM *et al.*, 2004) e voltar a produzir uma certa quantidade de GluNAc ou ácido N-acetilneuroamínico, que além da função estrutural, são uma boa fonte de energia para a célula (PLUMBRIDGE & VIMR, 1999).

### 3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é determinar o papel da molécula de LPS de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* na interação desta bactéria com a planta. Como objetivos parciais temos:

1. Obter estirpes de *H. rubrisubalbicans* mutantes dos genes *waaL*, *wecB* e *rmlB* por inserção de cassete contendo gene de resistência à canamicina (Km) através de vetor suicida *pSUP202*;
2. Determinar alterações no perfil do lipopolissacarídeo das estirpes selvagem e mutantes *waaL*, *wecB* e *rmlB* de *H. rubrisubalbicans*;
3. Determinar o fenótipo da colonização endofítica de milho (*Zea mays*) pelas estirpes selvagem e mutantes *rmlB*, *waaL* e *wecB* de *H. rubrisubalbicans*;
4. Determinar perfil de competição na colonização epifítica de raízes de milho entre os mutantes versus estirpes selvagens de *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1;
5. Determinar a participação dos genes *rmlB*, *waaL* e *wecB* na produção de biofilme por *H. rubrisubalbicans*
7. Caracterizar o fenótipo de resistência das estirpes selvagem e mutantes *waaL*, *wecB* e *rmlB* de *H. rubrisubalbicans* à estresse químico;
8. Determinar se as estirpes mutantes são capazes de causar a doença da estria vermelha em variedade susceptível de sorgo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 BACTÉRIAS

As estirpes bacterianas utilizadas estão listadas na TABELA 3:

TABELA 3: ESTIRPES E MUTANTES UTILIZADOS NESTE TRABALHO.

ESTIRPE	CARACTERÍSTICA	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	Estirpe para seleção do tipo blue/white screening devido a característica $\phi 80lacZ\Delta M15$ , $Sm^R$	INVITROGEN
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
SmR1	Variante espontâneo da estirpe tipo Z78, $Sm^R$ , $Nif^+$ , isolada de raízes de sorgo	PEDROSA <i>et al.</i> , 1997.
RAM4	<i>H. seropedicae</i> contendo plasmidio para expressão da proteína fluorescente DsRed, $Km^R$	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2008.
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>		
M1	Estirpe selvagem de <i>H. rubrisubalbicans</i> .	BALDANI <i>et al.</i> 1986.
<i>rmIB-</i>	Estirpe contendo um cassete de resistência a canamicina inserido no interior do gene <i>rmIB</i> . $Km^R$ , $Amp^R$ e $Cm^R$	Este trabalho
<i>waaL-</i>	Estirpe contendo um cassete de resistência a canamicina inserido no interior do gene <i>waaL</i> . $Km^R$ , $Amp^R$ e $Cm^R$	Este trabalho
<i>wecB-</i>	Estirpe contendo um cassete de resistência a canamicina inserido no interior do gene <i>wecB</i> . $Km^R$ , $Amp^R$ e $Cm^R$	Este trabalho

TABELA 3: ESTIRPES E MUTANTES UTILIZADOS NESTE TRABALHO.

### 4.2 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos e construções utilizados neste trabalho estão listados na TABELA 4.

PLASMIDIO	CARACTERISTICA	REFERÊNCIA
pSUP202	TcR, AmpR, CmR, <i>mob</i> .	SIMON <i>et al.</i> , 1983.
pSUP202rmlBKm	pSUP202 contendo gene <i>rmlB</i> truncado com cassete de canamicina no sitio TcR. AmpR, KmR.	Este trabalho
pSUP202waaLKm	pSUP202 contendo gene <i>waaL</i> truncado com cassete de canamicina no sitio TcR. AmpR, KmR.	Este trabalho
pSUP202wecBKm	pSUP202 contendo gene <i>wecB</i> truncado com cassete de canamicina no sitio TcR. AmpR, KmR.	Este trabalho
pGEM-T	Vetor TA, AmpR.	PROMEGA
pGEM-T <i>rmlBKm</i>	pGEM-T contendo gene <i>rmlB</i> truncado com cassete de canamicina. AmpR, KmR.	Este trabalho
pGEM-T <i>waaLBKm</i>	pGEM-T contendo gene <i>waaL</i> truncado com cassete de canamicina. AmpR, KmR.	Este trabalho
pGEM-T <i>wecBKm</i>	pGEM-T contendo gene <i>wecB</i> truncado com cassete de canamicina . AmpR, KmR.	Este trabalho

TABELA 4: PLASMÍDIOS UTILIZADOS E CONSTRUÍDOS NESTE TRABALHO.

#### 4.3 CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

As estirpes de *Herbaspirillum spp.* foram cultivadas em meio líquido NFb-malato (ANEXO 1) (KLASSEN *et al.*, 1997), contendo 50 mmol/L de solução de fosfatos (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,8 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 159,5 g/L) e 20mmol/L de cloreto de amônio, a 30°C, sob agitação a 120 rpm, por 24 horas. A adição de 15g/L e 1,75 g/L de ágar a esse meio da origem aos meios NFb-malato sólido e semi-sólido , respectivamente. *Escherichia coli* foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) (ANEXO 2) (SAMBROOK *et al.*, 1989) sob agitação a 120 rpm, à 37° C. A adição de 15 g/L de ágar ao meio LB origina o meio LA. Todos os meios foram esterelizados por autoclavação a 120°C, 1,2 atm, por 20 minutos.

#### 4.4 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos e as concentrações utilizadas para *E.coli* e *Herbaspirillum spp.* estão assinalados na TABELA 5:

ANTIBIÓTICO	SIMBOLO	[ <i>E.coli</i> ] (mg/ml)	[ <i>Herbaspirillum sp.</i> ] (µg/mL)
Canamicina	Km	100	500
Ampicilina	Amp	250	250
tetraciclina	Tc	10	10
estreptomicina	Sm	80	80
Cloranfenicol	Cm	30	10

TABELA 5: PREPARO DE ESTOQUES E CONCENTRAÇÕES USUAIS DOS ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.

As soluções estoques de antibióticos canamicina, ampicilina e estreptomicina, foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 25 0,45µm). A solução estoque de tetraciclina foi preparada em etanol 70% e a solução de cloranfenicol foi dissolvido em DMSO. Todas as soluções de antibióticos foram estocadas a -20°C e as soluções em uso foram mantidas a 4°C.

#### 4.5 PRIMERS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

A lista contendo os primers utilizados nesse trabalho indicando a sequência, temperatura de melting e qual gene amplifica estão contidos na TABELA 6.

Primer	Sequência	gene	T <sub>m</sub> (°C)
Y1	5'- TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	16S	55
Y3	5'- CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT		55
Hrubri 0001.3476 Fw	5'- CAAGGAGATCTGGGTCTATGCACGC TTC	waaL	58
Hrubri 0001.3476 Rv	5'- CTATAAACAGGATTCACTTAGATGGG CAGC		59
Hr_wecB I	5'- CAACATCGTCGACTGCTGACTCCAG ACGGCTGGCCTCGCTTACGA	wecB	60
Hr_wecB F	5'- AGACGGCTGATATCGCTTACGA		58
HR_RfbBFw	5'- ATCAAAGATCTCGACCCATATGA	rmlB	
HR_RFBcrV	5'- TGCCAGCGTTCGGGATCCTG		
M13 Fw	5'- GGTTTTCCCAGTCACGAC		55
M13 Rv	5'- GGAAACAGCTATGACCATG	lacZ	55

TABELA 6: LISTA DE PRIMERS UTILIZADOS NESSE TRABALHO.

#### 4.6 MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

As estirpes de *E. coli* foram estocadas em glicerol 50% a -20°C para uso contínuo ou -80°C para estoques de longo prazo. As estirpes de *Herbaspirillum spp* foram estocadas em frascos de vidros de 5mL contendo 4mL de meio NFbHPN semissólido, a temperatura ambiente, sem agitação e devidamente lacrados com filme de silicone. Os estoques em glicerol podem ser mantidos por até 12 meses, estirpes selvagens de *Herbaspirillum spp.* podem ser mantidos por até 6 meses em meio semissólido e as estirpes mutantes e principalmente as bactérias carreadoras de plasmídios devem ser repicadas com frequência.

#### 4.7 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

##### 4.7.1 Extração de DNA genômico



O DNA genômico foi extraído através da fervura direta de 500µL de cultura em fase estacionária ou de 1 colônia tomada de meio sólido em 500µL de água ultrapura estéril por 15 minutos e então centrifugar por 5 minutos a 10000g e utilizar o sobrenadante.

#### 4.7.2 Extração e purificação de DNA plasmidial

A técnica utilizada foi a lise alcalina ou miniprep (SAMBROOK, 1989).

1,5mL de cultura saturada contendo o plasmídeo de interesse foram centrifugadas por 1 minuto a 12.000g. As células foram ressuspensas em 150µL de tampão GET (glucose 50 mM, EDTA 1 mM, Tris 25 mM pH 8) contendo 1 U.I. de RNase fervida e incubada em banho de gelo por 5 minutos. 150µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18 M) foram adicionados e suavemente homogeneizado. Após no máximo 5 minutos, a lise foi interrompida pela adição de 150 µL de tampão KCAF (tampão fosfato e ácido fórmico 3M, pH 4,8). Após 30 minutos em banho de gelo a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 10000 g., o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e foi adicionado 150µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação por 5min a 10000g, o DNA plasmidial foi precipitado com etanol absoluto (3 volumes) e lavado com 1mL de etanol 70%. Após centrifugação por 25 minutos a 10000g, o DNA foi seco à vácuo e ressuspensão em 30 µL de água ultrapura. 10% do volume da amostra foi analisado em eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 4.7.3 Eletroforese em gel de agarose

As amostras foram misturadas com tampão de corrida de amostra FSUDS (Tris-HCl 65mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75mmol/L, Ficoll ® 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,025%) numa proporção de 5:1 e aplicadas diretamente no sistema contendo o gel de agarose (preparada com o mesmo tampão utilizado na corrida) em concentração adequada conforme o tamanho do DNA (foi utilizado 0,8% e 1%) e o tampão de corrida, o tampão tris-Acetato EDTA. A voltagem e o tempo de corrida

variaram conforme a amostra. Após a eletroforese, o DNA presente nos géis foi visualizado, após tratamento com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), sob luz ultravioleta 320 nm utilizando o sistema UVP (BioImagin Systems).

#### 4.7.4 Restrição do DNA

A restrição do DNA foi realizada conforme os protocolos dos fabricantes das enzimas de restrição (FERMENTAS ou INVITROGEN). Sistemas de reação de 50µL foram utilizados na obtenção dos fragmentos. A clivagem foi verificada por eletroforese em gel de agarose.

#### 4.7.5 Ligação de fragmentos de DNA

O vetor linearizado e o fragmento de DNA de interesse, devidamente clivado com as enzimas de restrição adequadas, foram quantificados através de densitometria em sistema UVP (BioImagin Systems) após eletroforese, usando o padrão de peso molecular 1Kb Ladder (FERMENTAS) como referência. O sistema de reação de ligação continha vetor linearizado e DNA inserto em uma razão molar de aproximadamente 1:5mol; T4 DNA ligase; e tampão de ligação, perfazendo o volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 16°C durante a noite. O produto da reação foi eletrotransformado em *E. coli* Top 10.

#### 4.7.6 Amplificação do DNA

O sistema de reação de PCR continha: 0,5 pmol de primers; 10ng de DNA molde; 0,2mM dNTPs, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> e 1 unidade internacional de TaqDNA polimerase e tampão para a enzima.

Neste trabalho foram utilizados os seguintes parâmetros para a PCR:

- Desnaturação inicial 96°C 60 segundos
  - Ciclos (30 a 35 ciclos):
- Desnaturação 96°C por 60 segundos
- Anelamento: 56°C por 45 segundos
- Extensão: 72°C por 90 segundos
  - Etapa de finalização: 72°C por 7 minutos

3µL de produto de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% para avaliar o perfil e concentração da amostra.

#### 4.7.7 Sequenciamento de DNA

1° etapa: reação de PCR, utilizando plasmídeo (200ng) como DNA molde ou uma colônia bacteriana diretamente no sistema de PCR. Para a confirmação da espécie utiliza-se o par de primers Y1 e Y3 (para o gene 16S rDNA), para o vetor pGEM-T são utilizados os primers universais M13R e M13F (para o gene *lacZ*) e para o vetor pSUP202 foram utilizados o primer direto dos genes e o primer kan (para o gene de resistência a Km). Esse produto de PCR foi tratado com 1 unidade de exonuclease I e fosfatase alcalina e incubado por 45 minutos a 37°C.

2° etapa: 200ng desse DNA molde foi utilizado para a reação de terminação de cadeia (segundo o protocolo de GE healthcare science). A reação continha 3µL do tampão contendo mistura de dideoxinucleotídeos, 0,5 pmol de primer e água ultra pura suficiente para completar 10µL. Os parâmetros da reação foram 1 minuto a 95°C e 35 ciclos de 1 minuto a 57°C e 3 minutos a 60°C. O produto de PCR foi precipitado, para isto foi utilizado 200mM de acetato de amônia e 2 volumes de etanol absoluto, essa solução foi incubada em banho de gelo por 30 minutos e é centrifugado a 10000g por 20 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o DNA foi lavado com 200µL de etanol 70% e centrifugado por 15 minutos a 10000g. O etanol foi desprezado e a amostra foi seca em temperatura ambiente com proteção contra a luz por 12 horas.

As amostras foram analisadas em um ABI PRISM 377 (Amersham-biosciences). Os resultados foram avaliados através do algoritmo BLAST do NCBI.

## 4.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

### 4.8.1 Transformação bacteriana utilizando células quimiocompetentes (CHUNG *et al.*, 1989)

A bactéria TOP10 foi inoculada em meio LB e incubada a 37°C sob agitação até atingir uma DO600 em torno de 0,5, 1,5mL dessa cultura foi centrifugado por 1 minuto a 10000g e o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em tampão TSS (meio LB contendo 10% (p/v) de PEG8000; 5%(v/v) de SDS; 50mM MgCl<sub>2</sub>), 5ng de DNA plasmidial foram adicionados ao sistema e o mesmo foi incubado em banho de gelo por 30 minutos. O sistema foi incubado em banho maria a 42°C, por 45 segundos e imediatamente transferido para o banho de gelo por 1 minuto. 400μL de meio LB foi adicionado ao sistema e as células foram recuperadas por 1 hora a 37°C. A suspensão foi plaqueada em meio LA contendo antibióticos de seleção e incubar até o aparecimento de colônias.

As colônias crescidas foram selecionadas e utilizadas para preparar DNA plasmidial para confirmação.

### 4.8.2 Transformação bacteriana utilizando células eletrocompetentes (DOWER *et al.*, 1990)

Em 10mL de NFb-Malato contendo 10mM de mistura de fosfatos, foi inoculado 1% de cultura saturada e incubado a 30°C/120rpm até que a DO600 atinja 1,0. A cultura foi centrifugada sob refrigeração (4°C) por 30 minutos a 4000g, o sobrenadante foi desprezado e as células lavadas com 1 volume de água ultrapura estéril gelada, essa etapa de lavagem foi repetida 3 vezes. Após a lavagem com água, as células foram lavadas com 1 volume de glicerol 10% e centrifugadas novamente, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas no glicerol adsorvido no frasco e divididas em alíquotas de 400μL. Para a eletroporação 5ng de DNA plasmidial foram misturados com uma alíquota e eletroporado em um Cell Porator (life technologies) com as seguintes especificações:( 4 KΩ, 330 μF para *E. coli* e 2,8KΩ, 330μF para *H. rubrisubalbicans*). Após eletroporação 1mL de meio NFb-Malato foi adicionado e as células recuperadas por 3 horas. Após esse período

as células foram plaqueadas em meio NFb-Malato sólido contendo antibióticos de seleção e incubadas até o aparecimento de colônias.

As colônias selecionadas (mutantes) foram confirmadas via sequenciamento direto de colônias e reconfirmadas pelo fenótipo do perfil do LPS em SDS-PAGE.

## 4.9 MÉTODOS DE EXTRAÇÕES DO LPS

### 4.9.1 Extração rápida de LPS para verificação de fenótipo por SDS-PAGE

A extração do LPS total para análise eletroforética foi realizada segundo BROUGHTON e colaboradores (2006), com algumas modificações. As células bacterianas foram obtidas pela centrifugação de 2mL de culturas das estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (DO600 = 1.5), foram lisadas em 80 µL de tampão de lise [1M Tris pH6,8; 4% β-mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,005% bromofenol azul] à 100°C por 10 min. A amostra foi resfriada à temperatura ambiente e em seguida foi adicionado ao sistema 2% de SDS (m/v) e 0.08 mg.mL<sup>-1</sup> de proteinase K, misturados e incubados à 60°C por 16 horas. Após incubação, 2 volumes de tampão de amostra [120mM Tris pH6,8; 3% SDS; 9% β-mercaptoetanol; 30% glicerol; 0,03% bromofenol azul] foram adicionados, e 5µL da mistura final foram aplicados em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 16% m/v), submetido a um campo elétrico de 100 V por 2 h e 30 minutos.

Esse gel foi revelado pela técnica do periodato de prata (TSAI & FRISCH, 1982).

### 4.9.2 Extração de LPS utilizando o método proposto por MAROLDA *et al.*, 2006.

A cultura saturada foi centrifugada, a massa celular foi ressuspensa em tampão de lise (SDS 2% e beta mercaptoetanol 4% em tris-HCL 0,5M pH 6,8) e fervida por 10 minutos. Quando a amostra esfriou até à temperatura ambiente, 100microgramas/mL de DNase I foram adicionados e a amostra foi incubada por 30

minutos a 37°C. Após esse período 80µL de proteinase K (20mg/mL) foram adicionados e a amostra incubada por 1 hora a 60°C.

A extração foi feita com 5 mL de fenol 90% pré-aquecido a 70°C, a amostra foi incubada a 70°C e agitada em vortex a cada 5 minutos por 3 vezes. A amostra foi então mantida por 10 minutos em banho de gelo e em seguida centrifugada por 10 minutos a 10000g.

As fases foram cuidadosamente separadas e a fase aquosa foram adicionados 10 volumes de etanol saturado com tris-EDTA a fase aquosa e centrifugado por 1 minuto a 10000g. O sobrenadante foi descartado e a amostra mantida a -20°C.

#### 4.9.3 Extração alternativa para LPS insolúvel na fase aquosa.

Embora o método mais empregado para a extração de LPS envolva extração a quente com fenol, em alguns casos o LPS está intimamente ligado a proteínas, mantendo-o preso à fase orgânica, nesses casos pode ser empregada o método de MORRISON & LEIVE, utilizando butanol como fase orgânica da extração.

A massa celular resultante da centrifugação foi ressuspensa em solução salina 0,9% e re-homogeneizada com auxílio de uma barra magnética, um volume igual de butanol saturado em água foi adicionado ao sistema, a partir dessa etapa todo o procedimento foi realizado a 4°C. A amostra foi homogeneizada por 30 minutos e então foi centrifugada por 30 minutos a 30000g, A fase aquosa foi separada e a fase orgânica re-extraída 2 vezes com 1 volume de salina, centrifugada e alíquotada.

20µg/mL de pronase foram adicionados a essa alíquota, a qual foi incubada durante a noite a 37°C. Essa amostra foi centrifugada por 30 minutos a 30000g e o sobrenadante límpido foi alíquotado, essas amostras contem o LPS e pode ser concentrado para a concentração desejada.

#### 4.10 ENSAIOS *IN PLANTA*

##### 4.10.1 Desinfecção das sementes de milho e sorgo

A desinfecção das sementes de milho foi feita com etanol 70% por 5 minutos, o etanol foi descartado e uma solução de hipoclorito de sódio 12% contendo 0,5% de polissorbitano 20 foi adicionada por mais 15 minutos. As sementes foram lavadas com água ultrapura 3 vezes e preparadas para o plantio hidropônico.

Para as sementes de sorgo, foi utilizado o protocolo acima, porém sem a desinfecção por etanol 70%, visto que as sementes desidratam facilmente.

##### 4.10.2 Plantio de milho e sorgo

O plantio foi feito em placas de Petri contendo ágar-água (0,8% de agar (p/v) em água ultrapura). As sementes desinfetadas foram transferidas para a placa de Petri e incubadas por até 3 dias (suficiente para que a plântula obtenha 1 centímetro de comprimento). Para o sorgo, o plantio em ágar-água foi substituído pelo plantio em vermiculita estéril.

##### 4.10.3 Inoculação das plântulas de milho e sorgo

As plântulas foram retiradas da placa de petri e submersas em uma suspensão de células ( $10^5$  células.mL<sup>-1</sup>) e incubadas por 30 minutos sob agitação (30°C a 120RPM). Após esse período, são lavadas com solução NaCl 0,9% estéril 3 vezes e colocadas para crescer em tubos de ensaio de 60mL de volume contendo 25mL de plant-medium (HOAGLAND & ARNON, 1950) estéril, onde apenas a raiz da plântula esteve em contato com o meio (Figura 4).

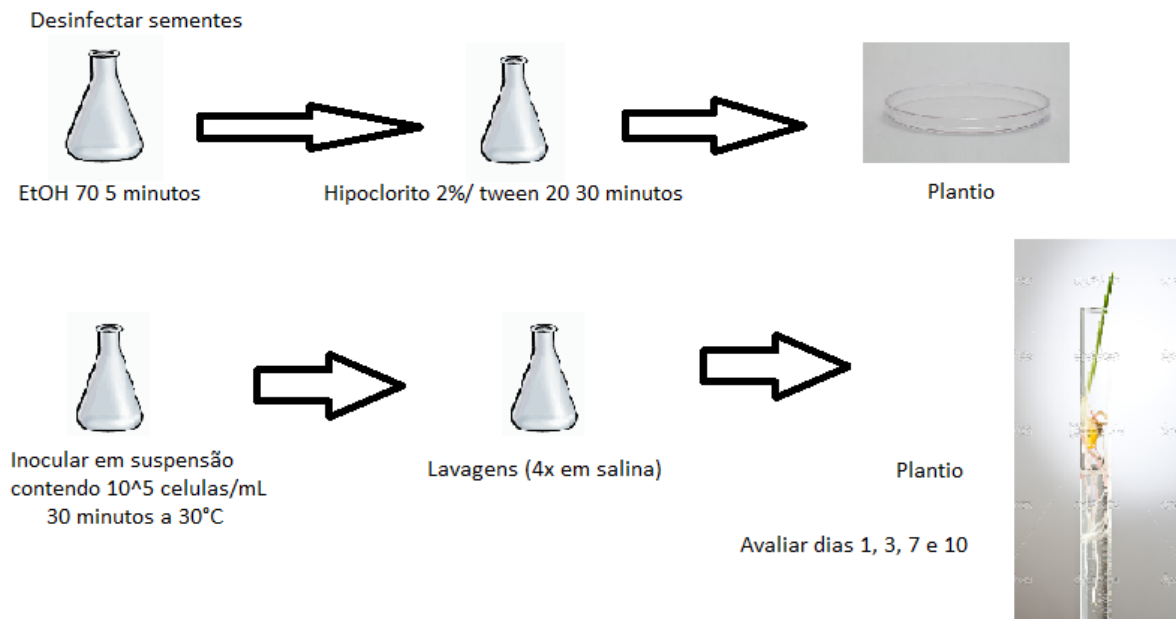


FIGURA 4: ESQUEMA DE PLANTIO HIDROPÔNICO E INÓCULO EM TUBO DE ENSAIO.

#### 4.10.4 Ensaios de adesão, colonização epifítica e endofítica de plântulas de milho

Para os ensaios de adesão e colonização epifítica a raiz principal foi seccionada e pesada de modo asséptico, utilizando um microtubo estéril. 1mL de salina estéril foi adicionado ao sistema e esse foi colocado sob agitação extrema (vortex) por 1 minuto. O sobrenadante foi diluído (diluições seriadas) e plaqueado pela técnica da microgota ou *pourplate*.

Para o ensaio de colonização endofítica, a raiz resultante do ensaio de colonização epifítica teve sua superfície esterilizada através de 1mL de etanol 70% por 1 minuto, o etanol foi desprezado e a raiz foi ressuspensa em salina estéril por 1 minuto. A raiz foi macerada em um gral e com o macerado foi feita diluição seriada, que foi plaqueada utilizando a técnica da microgota ou *pourplate* (Figura 5).

O esquema a seguir exemplifica o processo:



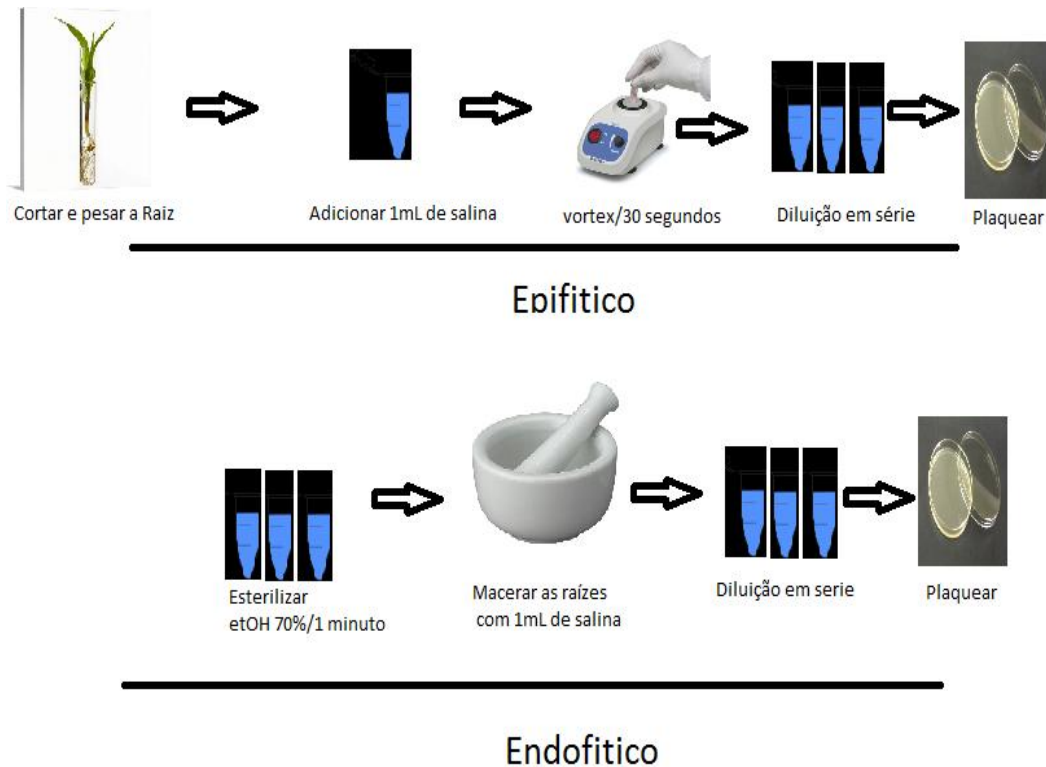


FIGURA 5: ESQUEMA DOS ENSAIOS DE ADESÃO, COLONIZAÇÕES EPIFÍTICA E ENDOFÍTICA.

#### 4.10.5 Ensaio de competição epifítica

Os ensaios de competição epifítica de raízes de milho foram realizados utilizando diferentes estirpes, em proporção 1:1 ou 1:9 (selvagem:mutante), mantendo o total de  $10^5$  células.mL<sup>-1</sup> de inóculo.

Foi realizado experimento de competição com LPS purificado (item 4.9.2.), onde a raiz da plântula é tratada com 10µg.mL<sup>-1</sup> de LPS purificado por 30 minutos antes da etapa de inóculo.

O restante dos experimentos segue como descrito no item 4.10.4.

#### 4.10.6 Ensaio de adesão a raiz de milho na presença de proteinase K.

Para avaliar se as proteínas de membrana externa são importantes para a ligação das bactérias a raiz, as células de *H. rubrisubalbicans* foram tratadas com uma concentração de  $8\mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteinase-K a  $30^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, e  $10^5$  células tratadas foram inoculadas por plântula de milho. O tratamento com proteinase-K não afetou a sobrevivência de *H. rubrisubalbicans*. Para avaliar se proteínas de superfície radicular são necessárias para a adesão bacteriana, as raízes de milho foram tratadas com  $5\mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteinase-K por 20 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$  e então inoculadas com  $10^5$  células de *H. rubrisubalbicans*.

Como controle foi feita uma reação com ambas a raiz e a cultura sem tratamento enzimático. O experimento segue como descrito para o ensaio de adesão.

#### 4.10.7 Determinação da capacidade das estirpes mutantes de *H. rubrisubalbicans* em causar a doença da estria vermelha em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor*

As estirpes de *H. rubrisubalbicans* foram inoculadas de duas maneiras:  $500\mu\text{L}$  de uma suspensão celular contendo  $10^5$  células. $\text{mL}^{-1}$  por perfuração do colmo da planta;  $1\text{mL}$  de uma suspensão celular contendo  $10^7$  células. $\text{mL}^{-1}$  diretamente sobre a raiz da planta. A forma de inoculação com perfuração do colmo da planta pode gerar estresse, para avaliar se os sinais da doença não foram gerados pelo estresse, foi empregado um método menos invasivo e mais próximo do que seria observado na natureza.

O desenvolvimento da doença foi avaliado através do aparecimento de manchas vermelhas nas folhas até 20 dias após o inóculo.

#### 4.11 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE BIOFILME ATRAVÉS DA FIBRA DE VIDRO

O ensaio se baseia na ligação da biomassa à lã de vidro e a capacidade de quantificação pela coloração com violeta genciana.

50mg de fibra de vidro estéril foram adicionados a 10mL de cultura cultivadas em meio NfbHPN ou somente em 10mL de meio NfbHPN (controle negativo). As amostras foram incubadas por 16 horas a 30°C e 120rpm.

O sobrenadante foi desprezado e a fibra de vidro foi lavada 3 vezes com salina estéril. 1mL de solução de violeta genciana 1% (p/v) foram adicionados e após 5 minutos o sobrenadante foi desprezado. A fibra de vidro foi lavada com salina até que não desprendesse resíduos da coloração. 1mL de etanol absoluto foi adicionado, o que causou a remoção do corante, e essa solução teve a sua absorbância determinada a 550nm.

Os resultados correspondem a  $DO_{550}$  das amostras subtraída da  $DO_{550}$  do controle negativo. Os resultados reportados representam a média de pelo menos três experimentos independentes, cada um com amostras em duplicata.

#### 4.12 RESISTÊNCIA A ESTRESSE QUIMICO

##### 4.12.1 Curva de crescimento das estirpes de *H. rubrisubalbicans* na presença de SDS e Acido salicílico.

A partir de uma cultura de *H. rubrisubalbicans* em meio NFBHPN com  $D.O_{600}$  inicial 0,050 foram retiradas aliquotas em intervalos de 1 hora e sua  $D.O_{600}$  determinada em um espectrofotômetro Pharmacia, de caminho ótico de 1cm.

As curvas foram feitas em concentrações crescentes de SDS e AS.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. rubrisubalbicans* POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

Os genes *waaL* e *wecB* foram amplificados via PCR utilizando DNA genômico de *H. rubrisubalbicans* M1 e ligados diretamente no vetor pGEM-T (PROMEGA). O vetor pGEM-T contendo o gene de interesse foi submetido a enzimas de restrição, truncando o gene de interesse (*waaL* cortado com *pstI* e *wecB* com *bgII*) aproximadamente na metade. A esse plasmídeo linearizado foi adicionado um gene de resistência a canamicina, proveniente do vetor pUC4k digerido com *BamHI*. Os produtos de restrição foram ligados. A ligação foi validada via restrição utilizando as mesmas enzimas usadas no processo de clonagem dos genes e os fragmentos liberados foram avaliados via eletroforese em gel de agarose.

A próxima etapa do processo de clonagem foi transferir o gene interrompido com o cassete de resistência a canamicina para o vetor suicida pSUP202, que será transformado em *H. rubrisubalbicans* gerando os mutantes dos genes *rmlB*, *waaL* e *wecB*. Os vetores contendo o gene truncado e o vetor pSUP202 vazio foram cortados com as enzimas *EcoRV* e *SaI* e o produto das restrições foi ligado. Novamente, o produto de ligação foi validado realizando a restrição reversa e avaliando o tamanho dos fragmentos gerados em eletroforese em gel de agarose.

O plasmídeo pSUPgeneKm foi então transformado via eletroporação em *H. rubrisubalbicans*, as possíveis mutantes foram selecionadas por resistência a antibióticos (canamicina e cloranfenicol). A confirmação foi feita em 3 etapas: PCR utilizando primer fw do gene e o primer Rv do gene de resistência a canamicina (gera fragmento maior que 1kb), sequenciamento desse produto de PCR e avaliação via algoritmos de alinhamento e avaliação fenotípica dos mutantes. A figura a seguir esquematiza o processo de obtenção dos mutantes:

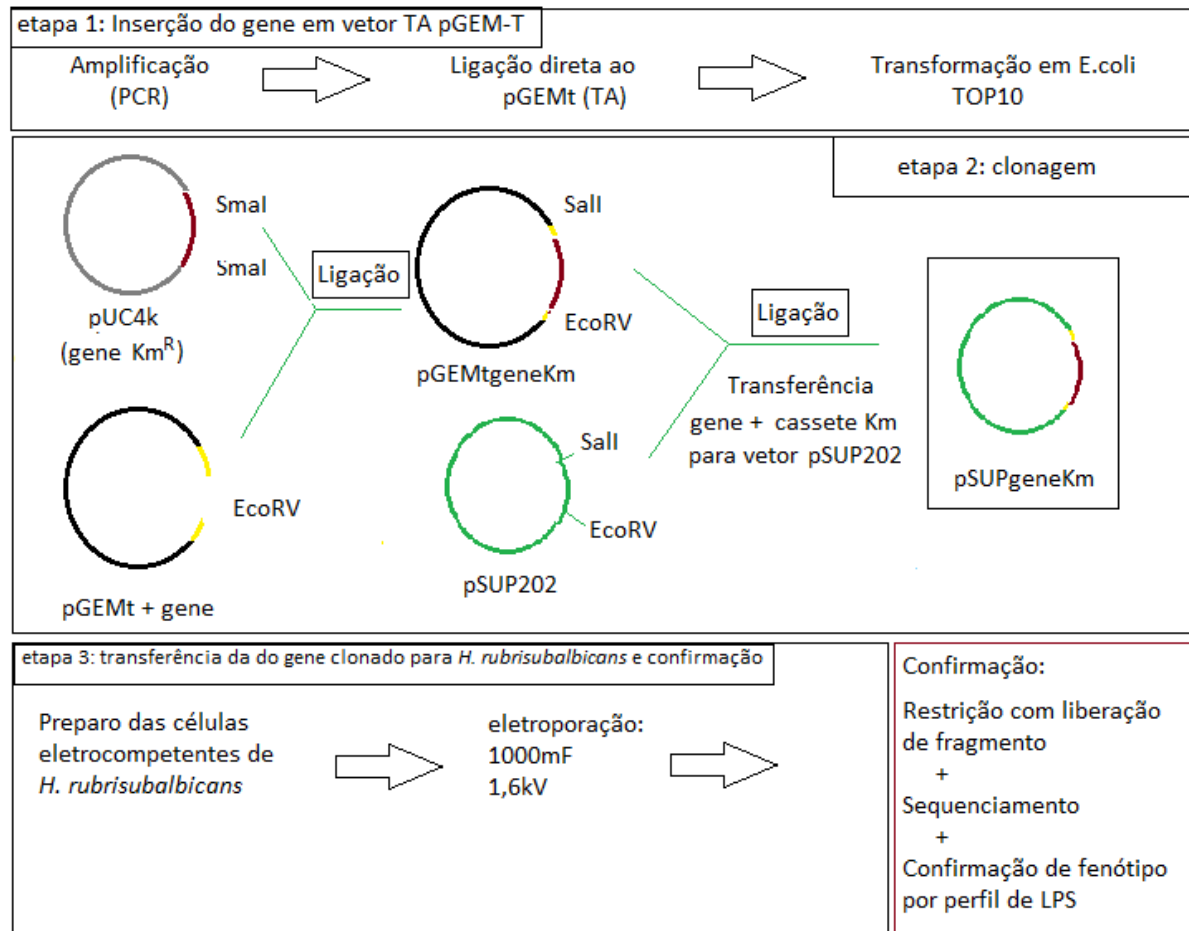


FIGURA 6: ESQUEMA DE CLONAGEM. 1ª etapa é referente a inserção do gene de interesse no vetor ta pgem-t e sua transformação em e.coli top10. na 2ª etapa, o gene de resistência a canamicina de um plasmídeo puc4k foi retirado por restrição com enzima smai e o o vetor pgem-t contendo o gene foi digerido por restrição, truncando o gene de interesse na metade. o gene de resistência a canamicina foi ligado ao vetor pgem-t interrompendo o gene de interesse. o vetor contendo o gene truncado foi digerido por restrição e o gene truncado com o gene de resistência a canamicina foi transferido para o sítio de resistência a tetraciclina do vetor suicida psup202. a terceira etapa é referente a transformação do vetor psup202geneKm em h.rubrisubalbicans por eletroporação e a seleção dos possíveis mutantes por resistência a antibióticos.

A figura a seguir representa a confirmação parcial do plasmídeo que será inserido em *H. rubrisubalbicans*, mostra a restrição do vetor pSUP202 contendo o gene truncado com o cassete de resistência a canamicina:

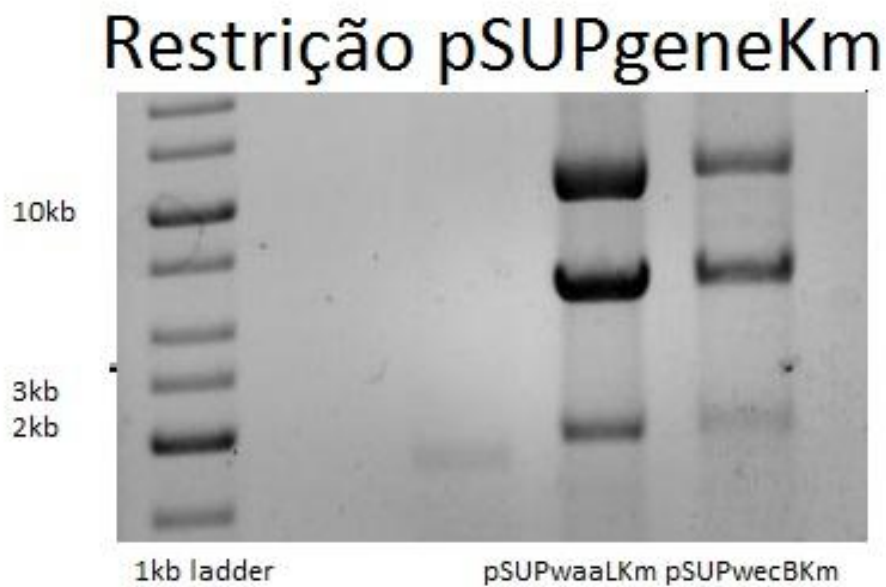


FIGURA 7: RESTRIÇÃO DO VETOR PSUP202. A figura mostra a restrição do plasmídio pSUPgeneKm feito com as enzimas *EcoRV* e *salI*. A visualização é feita em gel de agarose 1%, a eletroforese foi feita em tampão tae1x a uma diferença de potencial de 80V. A 1ª banda a esquerda mostra o padrão 1kb ladder (fermentas) e as bandas subsequentes mostram a restrição dos plasmídios. O gel foi revelado em brometo de etídio por 15 minutos e visualizado em transiluminador.

Após confirmação por restrição, os plasmídeos foram reconfirmados por sequenciamento utilizando os iniciadores universais m13 forward e m13 reverse (vetor *pGEMT*) ou pTETfw e pTETrev (específicos para o sítio de resistência a tetraciclina do vetor *pSUP202*). Os resultados dos sequenciamentos foram analisados através da ferramenta MEGABLAST do NCBI.

Os plasmídeos foram transformados em *H.rubrisubalbicans* estirpe M1, as estirpes mutantes foram geradas por recombinação. As colonias selecionadas pela pressão de seleção exercida pelos antibióticos foram triadas via PCR, fragmentos maiores de 1kb representam o gene de resistência a canamicina mais uma parte truncada do gene (FIGURA8).

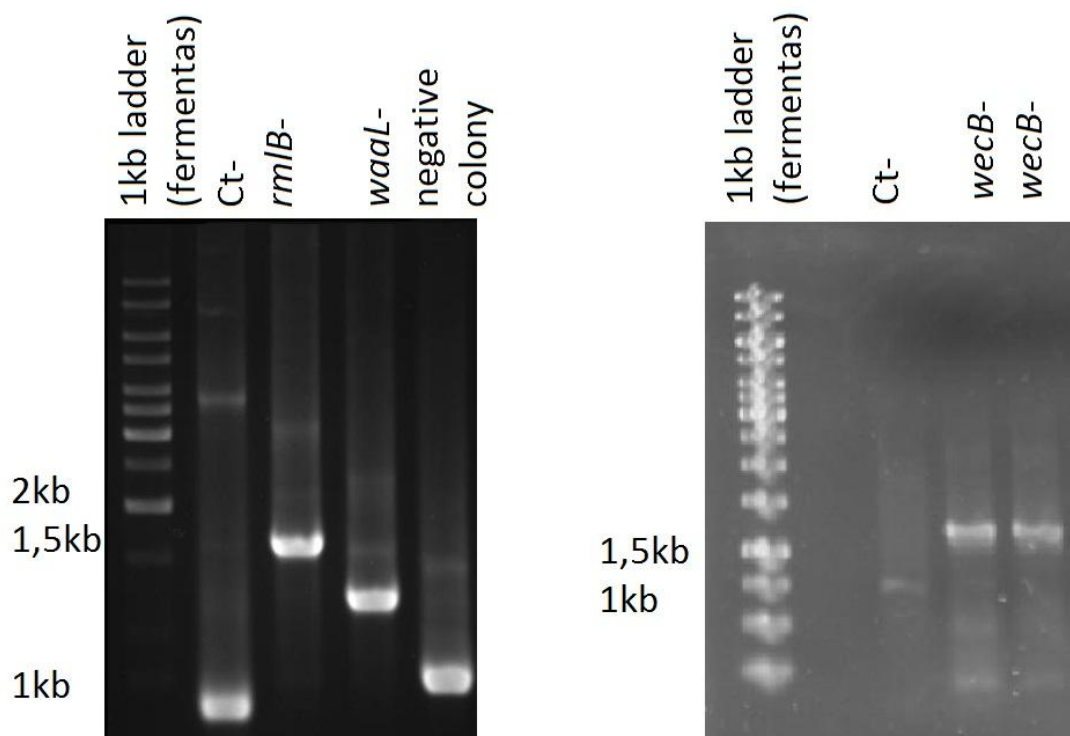


FIGURA 8: CONFIRMAÇÃO DOS MUTANTES DE *H. RUBRISUBALBICANS*. Eletroforese em gel de agarose 1% utilizando 1kb ladder (FERMENTAS). Mostra uma corrida contendo produto de PCR dos mutantes de *H. rubrisubalbicans*. Foram utilizados um primer fw para o gene de interesse e um primer rev para o gene de resistência a canamicina, a presença do produto de PCR com bandas de peso molecular maiores de 1kb são indicativo de mutante, as bandas de 1kb foram utilizadas como controle da reação de PCR e descartar presença de contaminantes.

A estirpe mutante *rmIB* foi obtida pela aluna Francine Myszynski.

## 5.2 MUTAÇÕES NOS GENES *rmIB*, *waaL* e *wecB* ALTERAM A MOLECULA DE LPS DE *H. rubrisubalbicans*.

Para verificar se as estirpes mutantes possuíam alguma alteração no perfil do LPS, essa estrutura foi extraída e avaliada em SDS-PAGE 16% corada com prata segundo a técnica descrita por TSAI & FRISCH. A extração foi conduzida de duas maneiras: a simplificada (FIGURA 9) descrita no item 4.9.1 e a extração orgânica (FIGURAS 10 e 11) descrita no item 4.9.2.

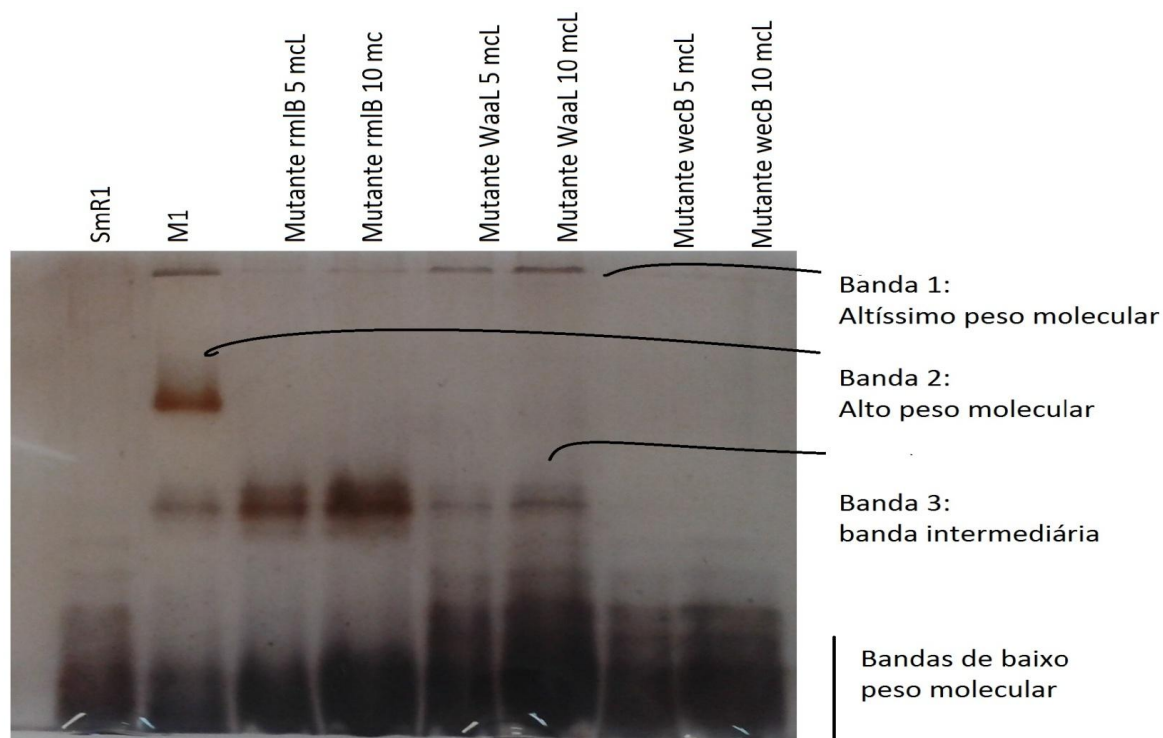


FIGURA 9: PERFIL DE LPS DOS MUTANTES DOS GENES *rmlB*, *wecB* e *waaL* de *H. rubrisubalbicans*. SDS-PAGE 16% - tampão TRIS-glicina, corrida de 210 minutos a 100 Volts. O gel foi corado com periodato de prata (TSAI & FRISCH, 1982). A estirpe SMR1 de *H. seropedicae* foi utilizada como controle. As amostras avaliadas foram aplicadas em duas concentrações com a premissa de observar todas as bandas possíveis. As bandas de baixo peso molecular representam o O-antígeno do LPS, as bandas intermediárias representam o centro de ligação com a parte lipídica e as bandas de altíssimo peso molecular podem indicar a presença de polissacarídeo capsular.

O perfil de LPS das estirpes mutantes e selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 foram comparados (FIGURA 9). Pode ser observado a presença de 3 bandas características nas colunas referentes ao *H. rubrisubalbicans* e seus mutantes: uma banda de altíssimo peso molecular, bandas de alto peso molecular e peso molecular intermediário (serão descritas mais detalhadamente nas FIGURAS 10 e 11) e bandas de baixo peso molecular. O perfil de LPS da estirpe M1 apresenta uma banda 2 que esta ausente no perfil das estirpes mutantes. A banda 1 (de altíssimo peso molecular) pode ser observada na estirpe selvagem M1 e na estirpe mutante *waaL*-, porém esta ausente ou em menor quantidade nas outras estirpes; a banda 3 (peso molecular intermediário) esta ausente apenas na estirpe *wecB*, porém esta aumentada na estirpe *rmlB*. As bandas de baixo peso molecular das estirpes *waaL* e *wecB* estão diferentes das bandas das estirpes selvagem e *rmlB*. Balsanelli e colaboradores, 2010 e 2012 também mostraram que mutações nos genes *rmlB* e *waaL* alteram a estrutura do LPS de *H. seropedicae*, dessa forma a estirpe selvagem



SmR1 foi utilizado como controle nos SDS-PAGE e permitiu-nos associar as bandas às estruturas do LPS.

Devido a falta de resolução na FIGURA 9, a extração orgânica foi empregada para avaliar o perfil de bandas da estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* com mais precisão (FIGURA 10).

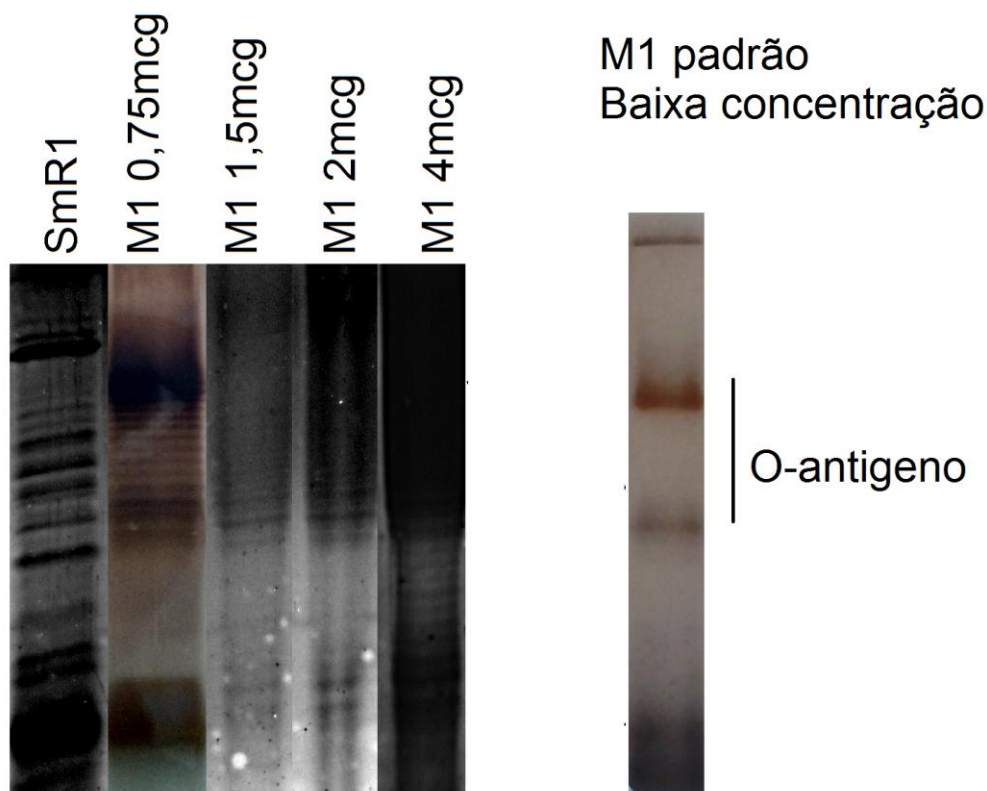


FIGURA 10: PERFIL DE LPS DA ESTIRPE SELVAGEM DE M1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. SDS-PAGE 16%, corrida feita em tampão tris-glicina a 100 volts por 210 minutos, coloração de TSAI & FRISCH. As diferentes concentrações utilizadas na corrida foram empregadas para demonstrar bandas abaixo da sensibilidade do método, mostrando a característica altamente truncada do LPS de *H. rubrisubalbicans*, característica que dificulta a demonstração de diferentes lipopolissacarídeos. a coluna com LPS de *H. seropedicae* SmR1 foi utilizada como controle, visto a caracterização prévia realizada por Balsanelli e colaboradores.

Pode ser observado o padrão extremamente diversificado, ou truncado, das bandas de *H. rubrisubalbicans* em relação ao *H. seropedicae*. Quando comparadas as FIGURAS 9 e 10, podemos correlacionar as bandas de alto peso molecular e as bandas de peso molecular intermediário formando um contínuo, representando a porção O-antígeno. A porção ECA apresenta peso molecular discretamente inferior ao do O-antígeno, ainda representada nas bandas de peso molecular intermediário.

As de baixo peso molecular, em comum entre *H. rubrisubalbicans* e o controle, representam o lipídio A.

A FIGURA 11 mostra a diferença entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e as estirpes mutantes, com alta resolução de bandas.

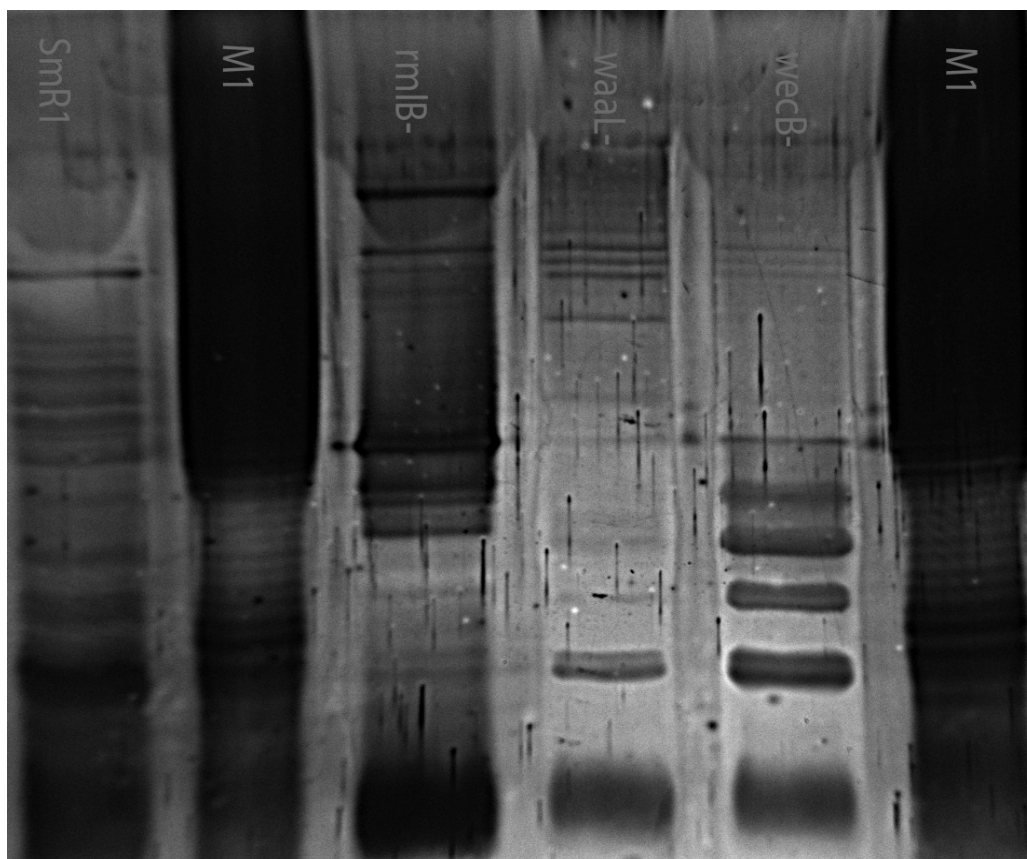


FIGURA 11: PERFIL DE LPS DE *H. RUBRISUBALBICANS* E SEUS MUTANTES E CONTROLE PURIFICADOS POR EXTRAÇÃO ORGÂNICA EM FENOL OU BUTANOL (SMR1). SDS-PAGE 16%, a 100 volts por 210 minutos, corado pela coloração de TSAI & FRISCH. A figura mostra as diferenças entre o LPS da estirpe selvagem e o LPS de seus mutantes. A deficiência no metabolismo da ramnose presente na estirpe *rmlB-* alterou a porção O-antígeno, tornando-a uma molécula menos diversificada. O LPS da estirpe *waaL-* apresentou apenas resíduos da porção O-antígeno e a estirpe *wecB-* apresentou um fenótipo diferenciado, como esperado, uma vez que o metabolismo geral da formação de carboidratos está comprometido. O LPS da estirpe SMR1 foi utilizado como controle.

Podemos observar claramente o padrão extremamente truncado presente na estirpe selvagem M1 de *H. rubrisubalbicans*. O mutante *rmlB-* contém as bandas representantes da porção O-antígeno, porém a deficiência no metabolismo de ramnose diminuiu severamente a variabilidade dessa porção, característica capaz de diminuir o potencial de adesão desse mutante à diversas superfícies. Os mutantes *waaL-* e *wecB-* não contam com a porção O-antígeno, contudo, o mutante *wecB-* teve acúmulo nas bandas referentes ao ECA.

Quando comparadas as estruturas do LPS de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, podemos observar um padrão de bandas muito mais complexo e diversificado em *H. rubrisubalbicans*, podendo indicar umas das razões das quais *H. rubrisubalbicans* é superior competitivamente em relação ao *H. seropedicae*.

### 5.3 AS MUTAÇÕES NOS GENES *rmlB*, *waaL* e *wecB* NÃO CAUSAM UMA DIMINUIÇÃO NO CRESCIMENTO DAS ESTIRPES MUTANTES EM RELAÇÃO A ESTIRPE SELVAGEM.

A curva de crescimento foi realizada para avaliar se alterações na estrutura do LPS levariam a possíveis alterações no crescimento dos mutantes, considerando o grande volume celular que a molécula representa e seu papel na interação com o ambiente ao seu redor. A FIGURA 12 mostra que a mutação nos genes *rmlB*, *waaL* e *wecB* não causou a diminuição da taxa de crescimento das estirpes mutantes.

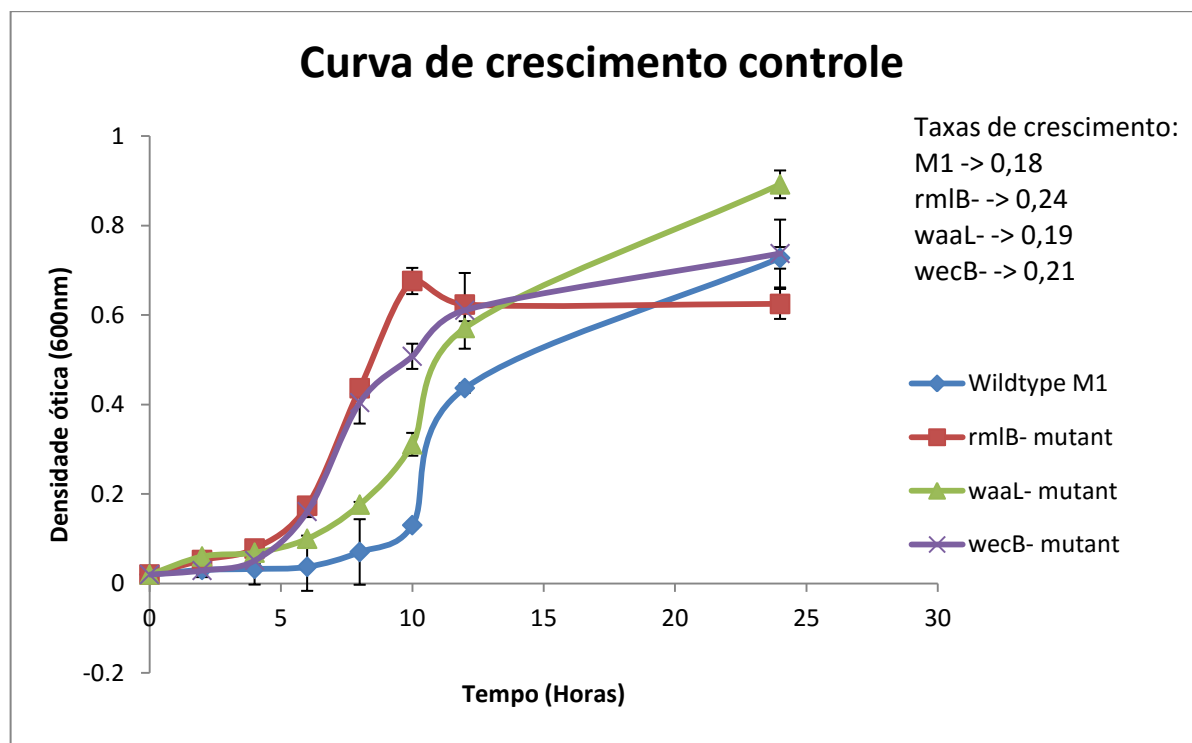


FIGURA 12: CURVA DE CRESCIMENTO CONTROLE COM A ESTIRPE SELVAGEM DE *H. rubrisubalbicans* E SEUS MUTANTES. O tempo de geração foi 0,26 (M1), 0,35 (*rmlB*), 0,27 (*waaL*), e 0,31 (*wecB*) Por hora e a taxa de crescimento representa a derivada da fase de crescimento linear das culturas. Experimento conduzido em 3 triplicatas em 3 dias diferentes. A estirpe selvagem teve uma taxa de crescimento discretamente inferior aos demais.

Em *H. seropedicae* a mutação no gene *rmlB* causou uma diminuição da taxa de crescimento da estirpe mutante (BALSANELLI *et al.*, 2010). O gene *rmlB* codifica para a 2ª enzima da via de biossíntese da ramnose, a proteína *rmlB* (dTDP-D-glicose 4,6-dehidratase) envolvida na biossíntese de dTDP-Ramnose. Modificações nessa via metabólica diminuem a taxa de crescimento de *H. seropedicae*, efeito esse que não é observado em *H. rubrisubalbicans*, indicando que o papel da ramnose pode ser diferente nesses 2 organismos. A mutação no gene *waaL* de *H. seropedicae* também não alterou a taxa de crescimento dessa bactéria, assim como foi observado para *H. rubrisubalbicans*, sugerindo que modificações na síntese da molécula de LPS não prejudicam o crescimento da bactéria.

#### 5.4 MUTAÇÕES NOS GENES *waaL* e *wecB* DIMINUEM A RESISTÊNCIA DE *H. rubrisubalbicans* a SDS.

As estirpes *rmlB*, *waaL* e *wecB* foram testadas quanto a sensibilidade ao SDS. O SDS é um composto desnaturante comumente utilizado no estudo da molécula de LPS. A estrutura completa do LPS, contendo o O-antígeno selvagem, conta com um volume celular suficiente para agir como anteparo ao contato com a substância, de modo que a ação surfactante do SDS não possa atingir a bicamada lipídica. A composição do O-antígeno conta com extrema variabilidade nas diferentes espécies bacterianas, essa variabilidade pode alterar as características físico-químicas e consequentemente a forma com que o microrganismo interage com o microambiente ao seu redor. A FIGURA 13 mostra que as estirpes que contem o O-antígeno (*H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1 e *rmlB*-), mesmo quando alterado, foram capazes de resistir ao aparecimento abrupto do SDS. As estirpes com ausência ou deficiência na na porção O-antígeno mostram sensibilidade em relação ao SDS. A taxa de sobrevivência das estirpes *waaL* (15 e 12%) e *wecB* (13 e 12%) nas concentrações de 0,02% e 0,04%, é menor quando comparadas com a taxa da estirpe selvagem (37 e 31%).

Sensibilidade aumentado frente a estresse químico devido a alterações na molécula de LPS já foi observado em outros microrganismos (CAMPBELL *et al.*,

2002; JOFRE *et al.*, 2004). A mutação nos genes *rmlB* de *H. seropedicae* e *A. brasiliense* também aumentou a sensibilidade dessas bactérias ao SDS (BALSANELLI *et al.*, 2010; JOFRE *et al.*, 2004)

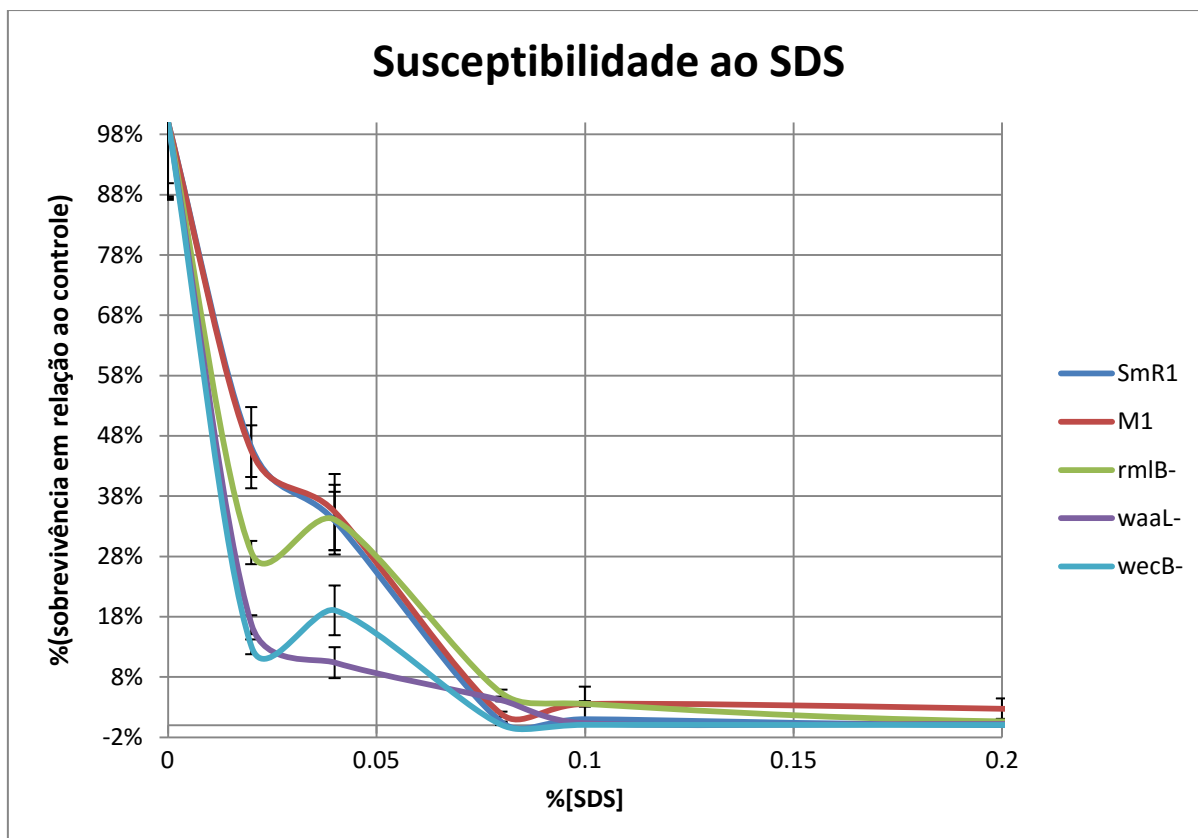


FIGURA 13: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE *H. rubrisubalbicans* M1 E SEUS MUTANTES NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO. As estirpes mutantes foram diluídas em série ( $1:10^1$  até  $1:10^7$ ) e plaqueadas em diferentes concentrações de SDS (0,01%, 0,02%, 0,04%, 0,08%, 0,1%, 0,5% e 1%) através da técnica da microgota, visando observar o número de células viáveis sob essas condições. As concentrações maiores que 0,2% foram omitidas devido ao baixo crescimento. Experimento feito em quintuplicata em 3 dias diferentes. O ligeiro crescimento observado entre as concentrações de 0,01 e 0,02% é possivelmente resultante do método de contagem. Pode-se observar a sensibilidade aumentada para as estirpes waaL- e wecB-, mostrando que apenas a ausência do O-antígeno ou da produção de biofilme levou a susceptibilidade a natureza desnaturante do SDS.

## 5.5 MUTAÇÕES NOS GENES *rmlB*, *waaL* e *wecB* DIMINUEM A RESISTÊNCIA DE *H. rubrisubalbicans* AO ÁCIDO SALICÍLICO.

O ácido salicílico é um importante metabolito secundário encontrado em plantas como defesa contra insetos e outros predadores. O estímulo predatório pode

levar a um aumento da produção do AS de uma concentração basal menor do que o equivalente a menos de  $1\mu\text{g.mL}^{-1}$  até concentrações maiores de  $200\mu\text{g.mL}^{-1}$  (RASKIN *et al.*, 1989). As concentrações testadas nesse experimento foram empregadas levando os níveis *in planta*.

A FIGURA 14 mostra que a taxa de sobrevivência das estirpes mutantes *waaL* e *rmIB* é menor que a da estirpe selvagem, sendo mais acentuada na concentração de 50 microgramas de AS. A estirpe *rmIB* de *H. seropedicae* também foi mais sensível ao AS (BALSANELLI *et al.*, 2010). Esses resultados indicam que mudanças estruturais na molécula de LPS alteram a sensibilidade de *H. rubrisubalbicans* ao SDS e ao AS.

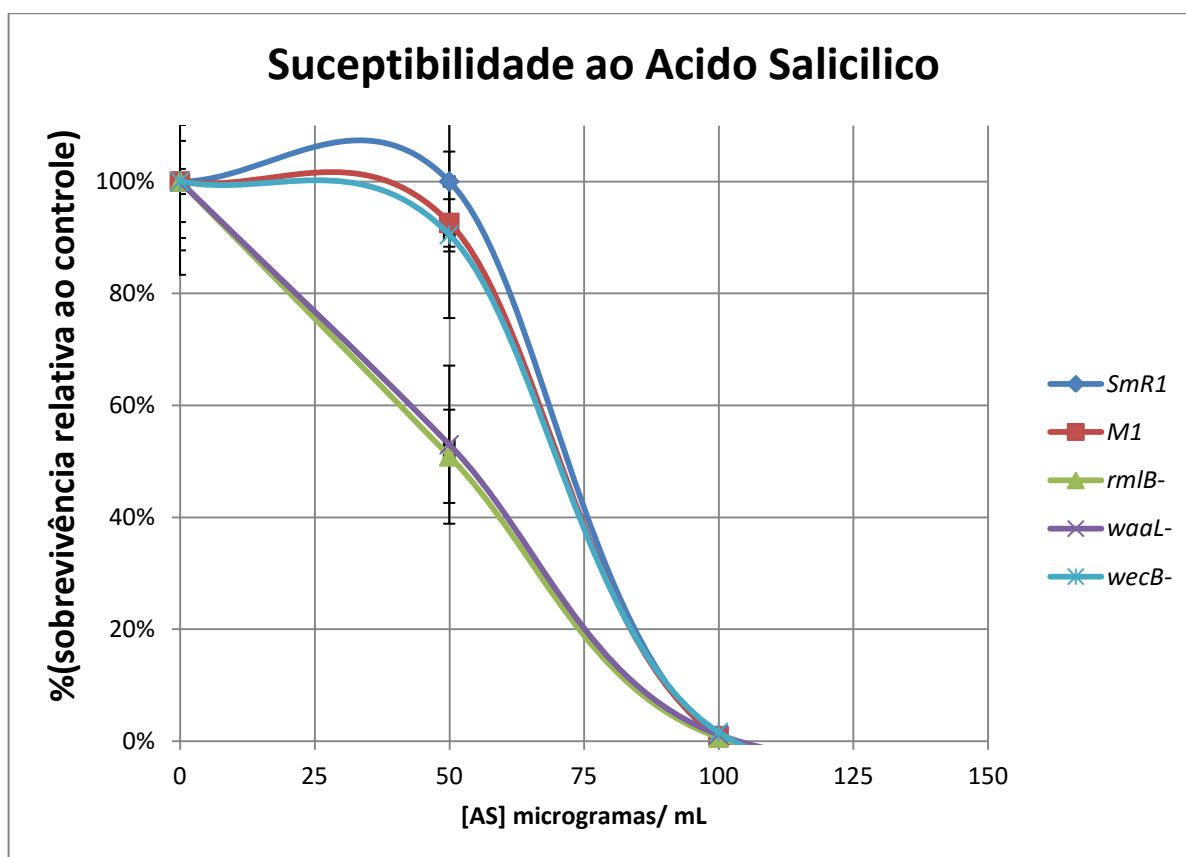


FIGURA 14: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE *H. rubrisubalbicans* E SEUS MUTANTES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ACIDO SALICILICO. Experimento feito em triplicata em 3 dias diferentes. *H. seropedicae* como controle do experimento, considerando os resultados prévios de Balsanelli e colaboradores. Pode-se observar a sensibilidade nas estirpes *rmIB*- e *wecB*-, mostrando que o O-antígeno é o responsável por impermeabilizar a célula para substâncias que este padrão de polaridade. Nesse caso, outros carboidratos parecem não estar envolvidos na susceptibilidade, uma vez que o mutante *wecB*- não foi alterado.

As alterações físico-químicas decorrentes da ausência da ramnose levaram à permeabilidade aumentada, observado até mesmo em baixas concentrações do AS. O AS é uma substância polar que contendo um anel aromático, alterações na estrutura da porção O-antígeno, presente nos mutantes *rmlB*- e *waaL*- respectivamente, tornam a molécula menos polar diminuindo a possibilidade de interação com o AS. O grande volume do LPS aliado a polaridade do O-antígeno, não permite que a molécula de AS tenha contato com a bicamada lipídica, como observado nas estirpes selvagens. Quanto ao resultado observado na estirpe *wecB*-, embora o metabolismo de carboidratos seja alterado, o mutante conta com o metabolismo de ramnose intacto e com a presença da O-antígeno ligase, embora o perfil de LPS seja extremamente alterado, não se pode excluir a possibilidade da presença de moléculas completas barrando a aproximação do AS.

As estirpes selvagens não apresentaram declínio aparente até aproximadamente  $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ , acentuando em torno de  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As estirpes mutantes *waaL* e *rmlB* mantiveram um declínio diretamente proporcional a concentração de AS. Vale frisar que todas as estirpes não foram capazes de se desenvolver a partir de  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ , dessa forma é possível afirmar que as espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* não seriam capazes de se desenvolver e colonizar plantas com uma resposta muito elevada de AS como resposta ambiental.

## 5.6 MUTAÇÕES NOS GENES *rmlB*, *waaL* e *wecB* não alteram a capacidade do *H. rubrisubalbicans* adesão as raízes de milho.

A capacidade das estirpes mutantes de *H. rubrisubalbicans* em colonizar epifiticamente e endofiticamente raízes de milho foi avaliada com o objetivo de determinar a função do LPS na interação com a planta.

Os resultados mostrados na FIGURA 15 indicam que as estirpes mutantes colonizam epifiticamente e endofiticamente as raízes de milho da mesma maneira que a estirpe selvagem. Esses resultados sugerem que alterações na molécula de LPS de *H. rubrisubalbicans* não afetam a capacidade desta bactéria de colonizar raízes de milho.

Os mutantes *rmlB* e *waaL* de *H. seropedicae* tiveram a sua capacidade de colonização de raízes de milho diminuída indicando que nessa bactéria a estrutura da molécula de LPS é importante para o processo de colonização (BALSANELLI *et al.*, 2010 e 2013). Apesar de macroscopicamente essas duas bactérias apresentarem o mesmo padrão de colonização, podemos sugerir que algumas moléculas envolvidas nesse processo são diferentes.

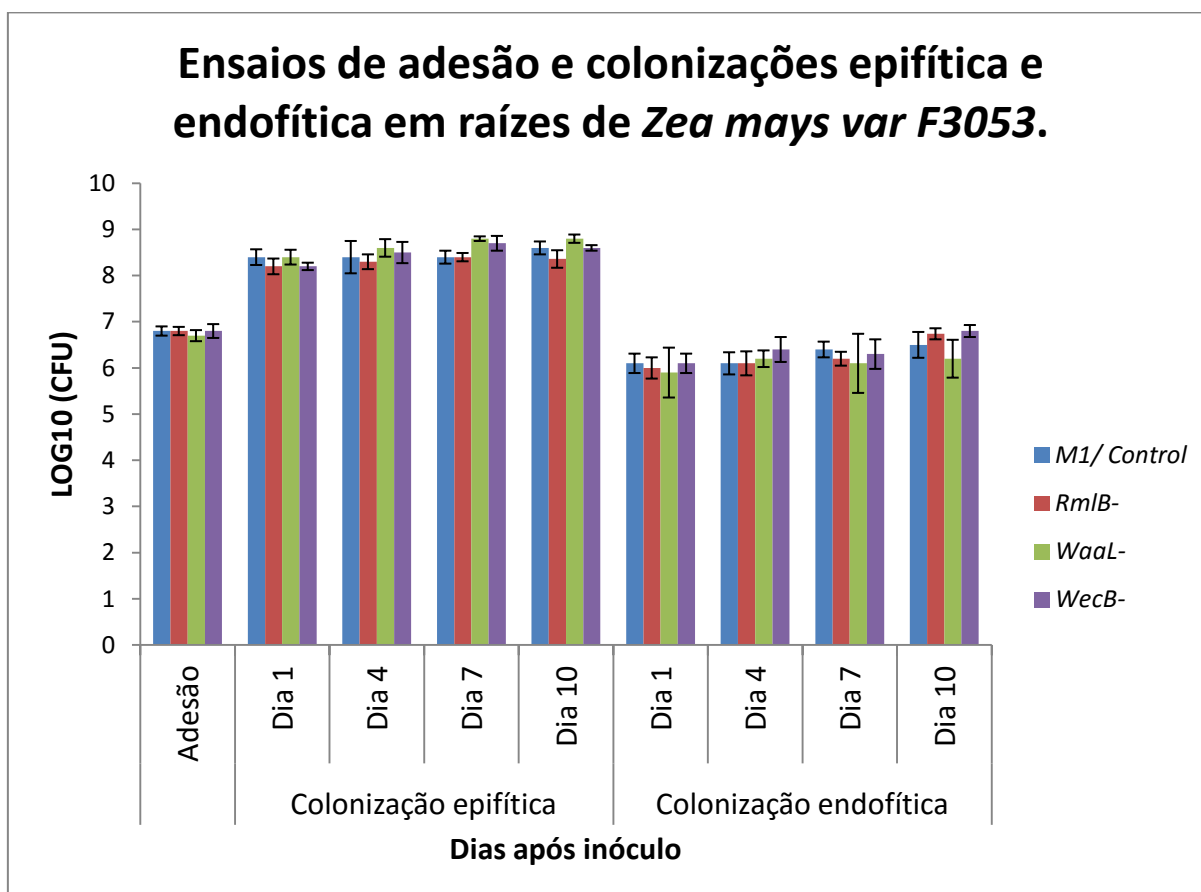


FIGURA 15: PERFIL DE ADESÃO, COLONIZAÇÃO EPIFÍTICA E COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *H. rubrisubalbicans* e seus mutantes em milho (*Zea mays* variedade f3053). Temos o número de unidades formadoras de colônias em função do tempo da inoculação (dias). O gráfico acima é dividido em três: a adesão (representa a capacidade de adesão da bactéria após 30 minutos da interação com a raiz, a colonização epifítica (feita nos dias 1, 4, 7 e 10) com a contagem de células viáveis aderidas a superfície radicular e a colonização endofítica (dias 1, 4, 7 e 10) com a contagem de células viáveis contidas dentro da raiz. Esse experimento foi realizado 8 vezes (5 triplicatas e 3 quintuplicadas). Pode ser observado que não houve diferença significativa na adesão e colonização da plântula de milho nessa condição não-multifatorial, mostrando que o LPS de *H. rubrisubalbicans* não está relacionado com essa etapa especificamente.

O experimento mostrado na FIGURA 15 não leva em consideração a natureza multifatorial da competição presente na rizosfera. Como observado no perfil de LPS



mostrado na FIGURA 11, a molécula de LPS de *H. rubrisubalbicans* conta com uma natureza extremamente truncada, indicando alta variabilidade da estrutura de LPS presente na superfície de uma única bactéria, isso aumenta exponencialmente a possibilidade de adesão a diferentes moléculas e estruturas pelo *H. rubrisubalbicans* além da possibilidade de moléculas de natureza proteica auxiliarem no processo de adesão. Para elucidar as questões levantadas por esse experimento, serão realizados experimentos de competição utilizando *H. seropedicae*, que já teve seu processo de adesão elucidado por Balsanelli e colaboradores e ensaios de competição entre as diversas estirpes de *H. rubrisubalbicans*, buscando por possíveis porções do LPS que possam auxiliar no processo de adesão e colonização.

#### 5.7 AS ESTIRPES *waaL* e *wecB* de *H. rubrisubalbicans* SÃO MENOS COMPETITIVAS QUE A ESTIRPE SELVAGEM M1 EM COLONIZAR EPIFITICAMENTE RAÍZES DE MILHO.

Nas FIGURAS 16 e 17 temos os resultados referentes a competição em proporção 1:1 entre a estirpe selvagem M1 de *H. rubrisubalbicans* e seus mutantes para o dia 0 (ensaio de adesão) e dia 1 (colonização epifítica). Esse experimento nos permite avaliar se o LPS é importante na adesão, na colonização epifítica ou até mesmos se é um fator determinante na competitividade na rizosféra. A FIGURA 16 mostra que o LPS não é essencial na adesão com a raiz, uma vez que a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* não deslocou competitivamente as estirpes mutantes, mantendo a proporção 1:1 do inoculo no dia 0. Por outro lado, a FIGURA 17 mostra que as estirpes *waaL*- e *wecB*- foram deslocadas competitivamente pelas estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* na colonização epifítica. Já foi mostrado por Tuleski e colaboradores que *H. seropedicae* é deslocado por *H. rubrisubalbicans*, inclusive em proporções com excesso de *H. seropedicae*, por isso foi empregado como controle do experimento. A FIGURA 17 nos mostra que alteração na composição do O-antígeno não alterou a competitividade na colonização epifítica contra a estirpe selvagem (M1 contra rmlB-), porém a ausência da porção O-antígeno alterou a capacidade de competição na estirpe *waaL*-, mostrando que a

presença do O-antígeno é um importante fator de competitividade em *H. rubrisubalbicans*, seja pela ausência completa (waaL-) ou pela diminuição da molécula na superfície da célula (wecB-).

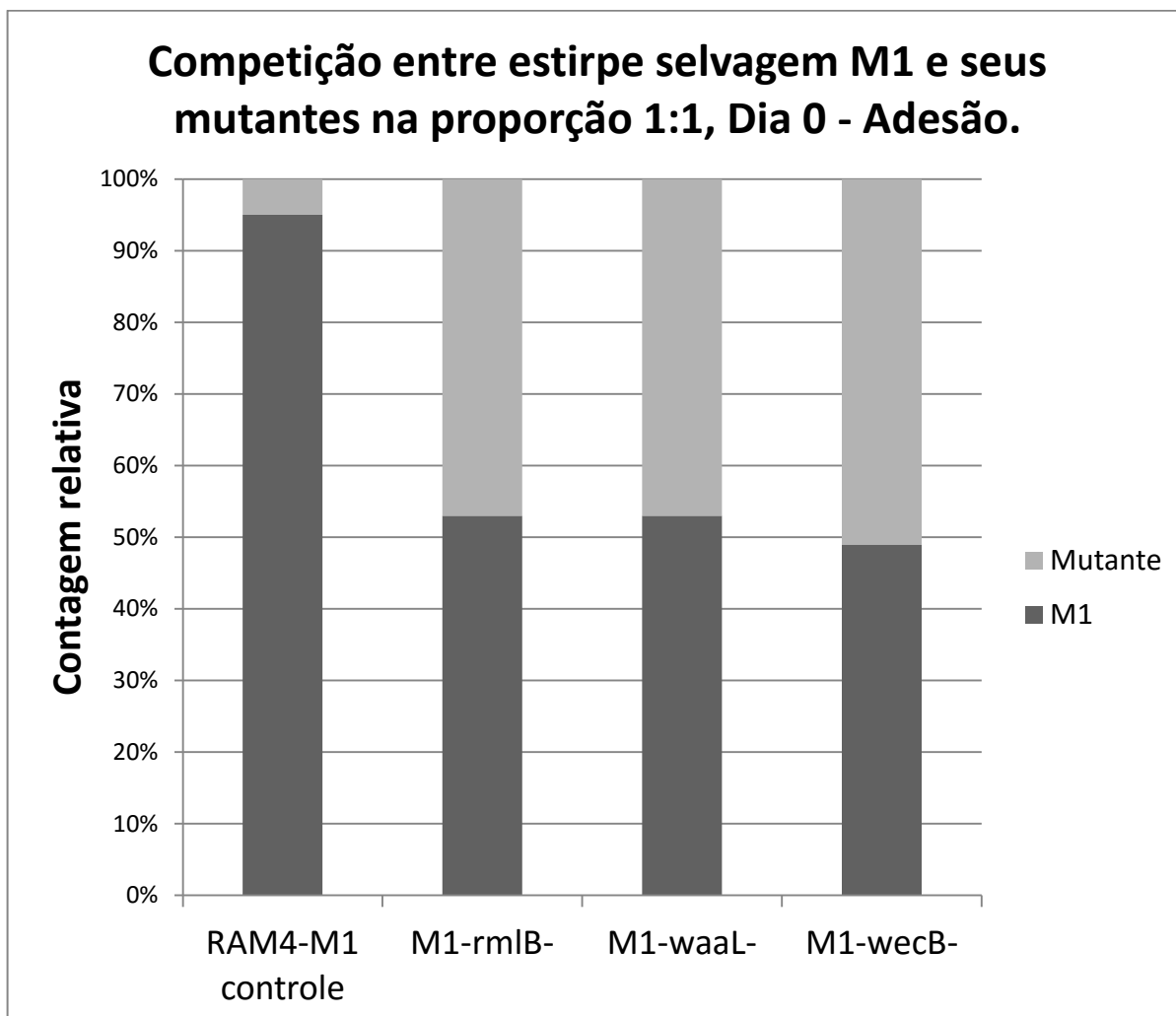


FIGURA 16: PERFIL DE COMPETIÇÃO NA ADESÃO ENTRE *H. rubrisubalbicans* E SEUS MUTANTES. A figura acima mostra a proporção obtida nas contagens totais e diferenciais (contendo Km) para uma mistura na proporção 1:1. Esse experimento corresponde ao dia 0, Adesão após 30 minutos do inóculo. Como controle do experimento foi empregado *H. seropedicae* RAM4, resistente a Km. Experimento realizado 3 em triplicata em repetido em 3 dias diferentes. *H. seropedicae* (RAM4), Em trabalhos de competição anteriores a este, já foi demonstrado que *H. seropedicae* é incapaz de competir com *H. rubrisubalbicans*, desse modo foi utilizado como controle do experimento. Pode ser observado que para o dia 0, não há diferença significativa na competição pela superfície radicular entre a estirpe selvagem e suas mutantes, indicando que o LPS não é o principal fator na competitividade superior do *H. rubrisubalbicans* na etapa de adesão.

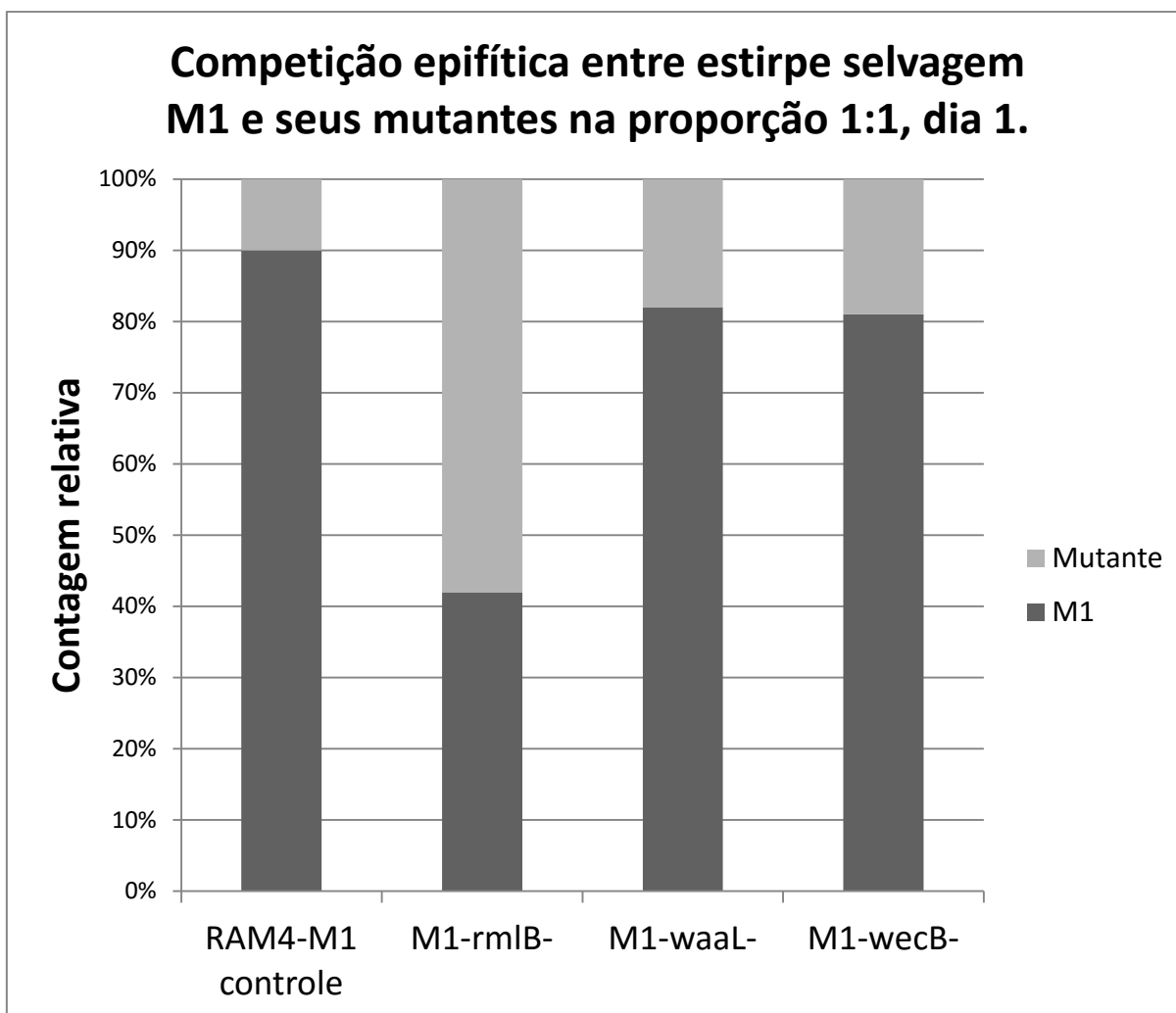


FIGURA 17: PERFIL DE COMPETIÇÃO EPIFITICA ENTRE *H. rubrisubalbicans* E SEUS MUTANTES. A figura acima mostra a proporção obtida nas contagens totais e diferenciais (contendo Km) para uma mistura na proporção 1:1. Esse experimento corresponde ao dia 1, competição na colonização epifítica. Como controle do experimento foi empregado *H. seropedicae* RAM4, resistente a Km. Experimento realizado em 3 triplicatas em 3 dias diferentes. Em detrimento da FIGURA 16, esse experimento mostra que embora o LPS não seja um fator determinante na adesão com a superfície radicular, as modificações presentes nas estirpes waaL- e wecB- permitiu que a estirpe selvagem se propagasse de maneira mais efetivamente durante a colonização epifítica, mostrando que o O-antígeno é um fator importante na colonização por *H. rubrisubalbicans*.

A próxima etapa visa avaliar se existe alguma relação entre a adesão e colonização do *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*.

Devido a menor capacidade de competição de *H. seropedicae* em relação a *H. rubrisubalbicans*, as FIGURAS 18 e 19 mostram as competições feitas entre *H. seropedicae* e os mutantes de *H. rubrisubalbicans*. Como esperado, a estirpe selvagem M1 *H. rubrisubalbicans* foi capaz de deslocar completamente a adesão de *H. seropedicae* completamente. Embora todas as mutantes mais eficientes no

processo de adesão do que *H. seropedicae*, as estirpes com deficiência na porção O-antígeno (waaL- e wecB-) foram discretamente menos eficientes (FIGURA 18).

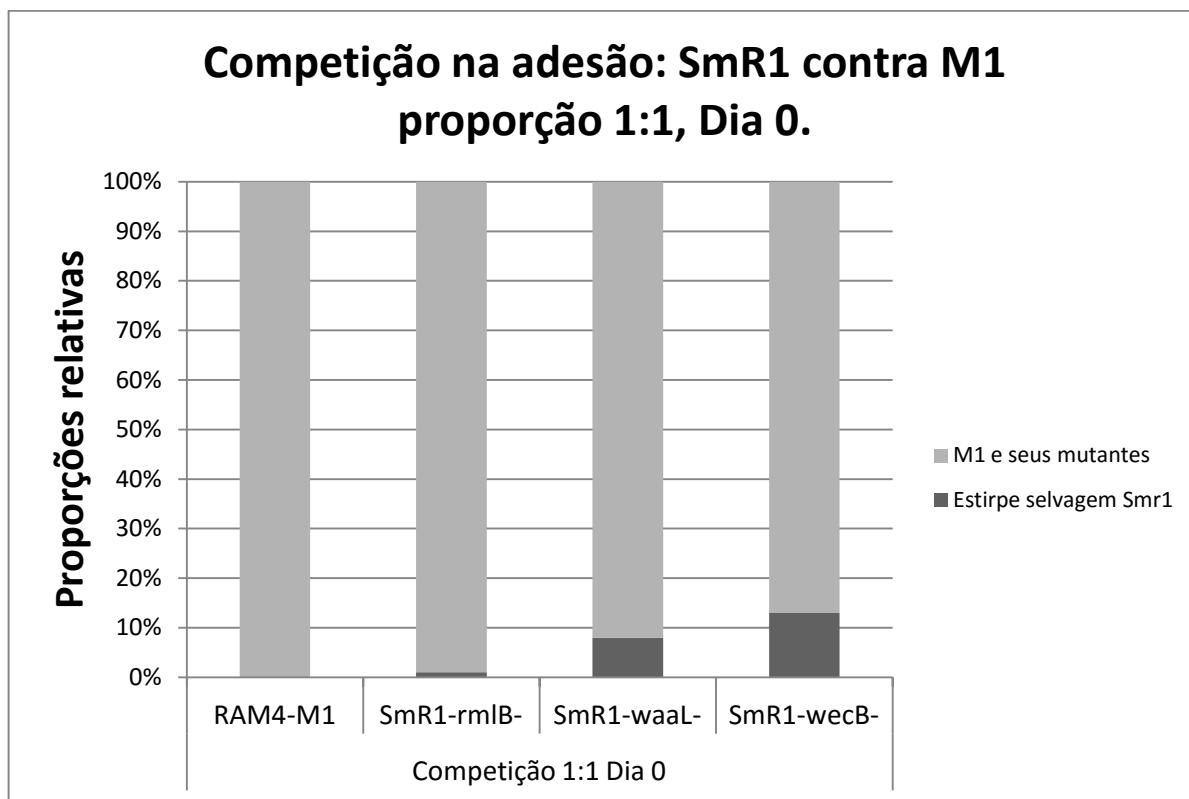


FIGURA 18: PERFIL DE COMPETIÇÃO DURANTE O TESTE DE ADESÃO PARA *H. RUBRISUBALBICANS* E SEUS MUTANTES CONTRA *H. SEROPEDICAE* SmR1. Dia 0. A figura acima mostra a proporção obtida nas contagens totais e diferenciais (contendo Km) para uma mistura na proporção 1:1. Esse experimento corresponde ao dia 0, competição na adesão. Neste experimento, além da estirpe RAM4 utilizado para o controle contra *H. rubrisubalbicans* M1, *H. seropedicae* SmR1 foi utilizado na competição contra os mutantes de *H. rubrisubalbicans*. Experimento realizado em 3 triplicatas em 3 dias diferentes. No inoculo 1:1, quando a barra de contagem mostra 50%, não houve deslocamento competitivo. *H. rubrisubalbicans* desloca *H. seropedicae* competitivamente, porém, ao diferente do observado na FIGURA 16, as estirpes mutantes waaL- e wecB- não foram capazes de deslocar *H. seropedicae* completamente durante a adesão.

Embora os resultados indiquem que o mecanismo de adesão de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* não estejam relacionados (FIGURA 18 e reforçado na FIGURA 20), *H. seropedicae* foi capaz de deslocar o mutante waaL- no processo de colonização epifítica (FIGURA 19), reforçando que a porção O-antígeno é um importante fator competitivo para *H. rubrisubalbicans*.

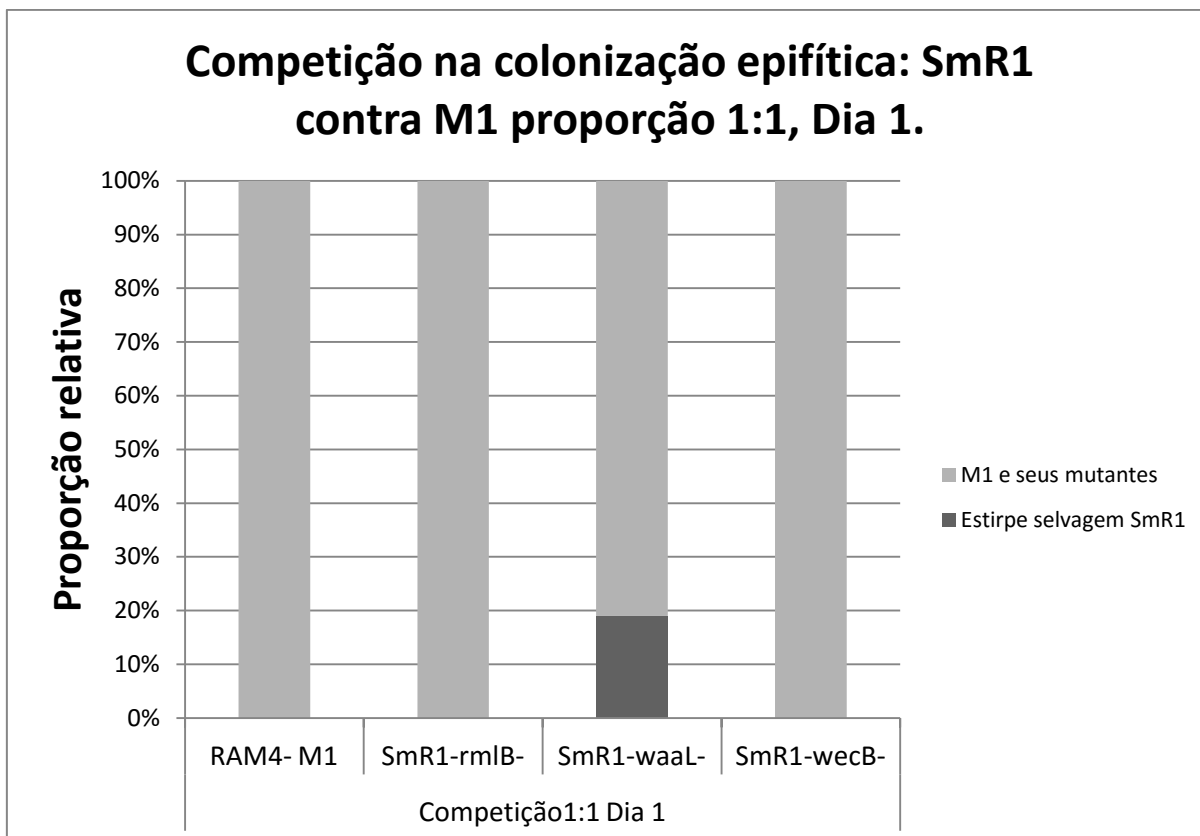


FIGURA 19: PERFIL DE COMPETIÇÃO EPIFITICA DE *H. RUBRISUBALBICANS* CONTRA *H. SEROPEDICAE* SmR1. Dia 1. Dia 0. A figura acima mostra a proporção obtida nas contagens totais e diferenciais (contendo Km) para uma mistura na proporção 1:1. Esse experimento corresponde ao dia 1, competição na colonização epifítica. Neste experimento, além da estirpe RAM4 utilizado para o controle contra *H. rubrisubalbicans* M1, *H. seropedicae* SmR1 foi utilizado na competição contra os mutantes de *H. rubrisubalbicans*. Experimento realizado em 3 triplicatas em 3 dias diferentes. No inoculo 1:1, quando a barra de contagem mostra 50%, não houve deslocamento competitivo. Novamente, a estirpe waaL- não foi capaz de deslocar completamente *H. seropedicae*, mostrando que o O-antígeno do LPS pode ser um importante fator na colonização epifítica.

Para *H. seropedicae*, alterações da estrutura do LPS de *H. seropedicae* diminuem a sua competitividade de modo mais evidente (BALSANELLI *et al.*, 2010) indicando novamente que a molécula de LPS de *H. rubrisubalbicans* não possui o mesmo papel que a de *H. seropedicae* em relação a adesão da raiz de milho.

Balsanelli e colaboradores (2013b) mostraram que a molécula de LPS de *H. seropedicae* se liga a lectinas de raiz de milho sendo um dos pontos de adesão entre a bactéria e a planta. Para excluir a possibilidade de competição entre *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, foi feito em experimento de competição entre as estirpes de *H. rubrisubalbicans* e LPS purificado de *H. seropedicae* em excesso. A FIGURA 20 nos mostra que a presença de altas quantidades de LPS purificado não alteraram o padrão de adesão em *H. rubrisubalbicans*.

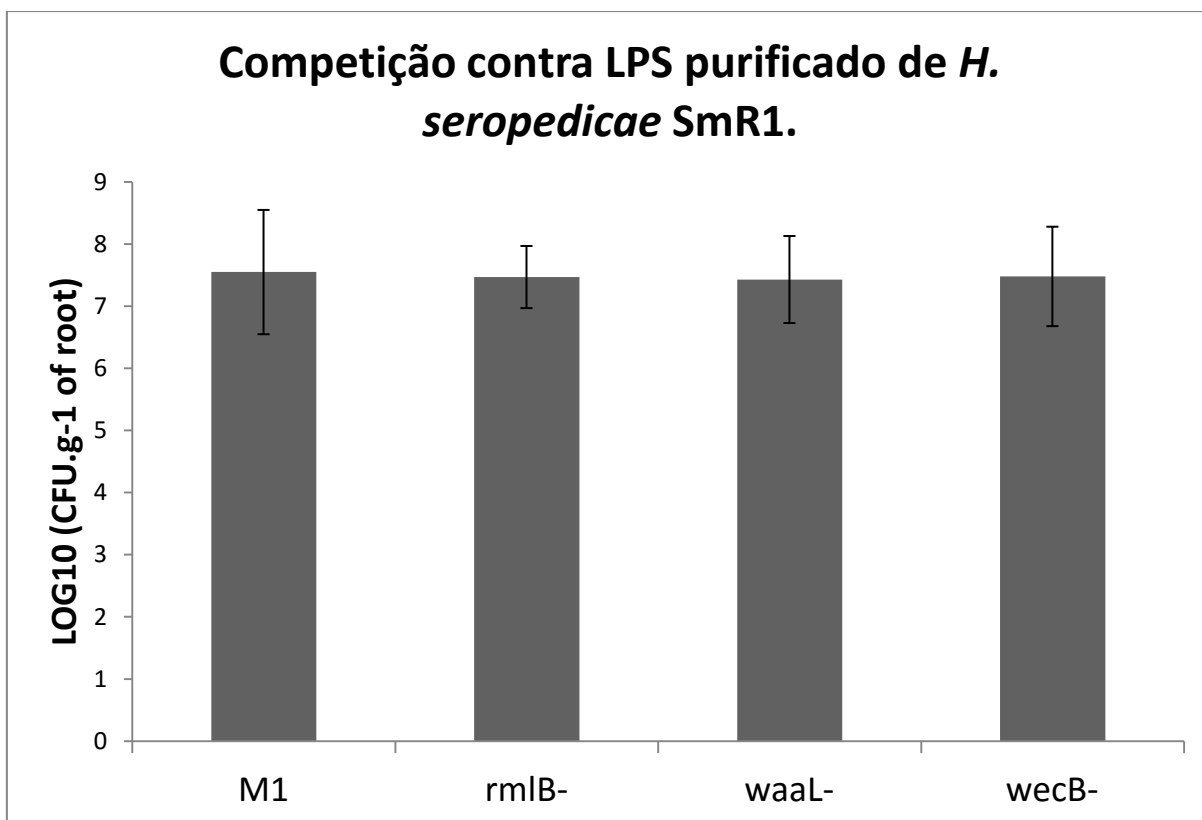


FIGURA 20: PERFIL DE COMPETIÇÃO DE *H. rubrisubalbicans* E SEUS MUTANTES CONTRA LPS PURIFICADO DE *H. seropedicae*. Foram feitas contagens de células viáveis num modelo de experimento de competição na adesão, no entanto, foram incubados  $1\mu\text{g.mL}^{-1}$  de LPS purificado de *H. seropedicae* SmR1. O LPS de *H. seropedicae* se liga a lectinas da superfície radicular, tendo isso em vista, foi feito esse experimento para avaliar se a adesão de *H. rubrisubalbicans* seria alterada. a adesão não foi alterada, mostrando que o LPS de *H. rubrisubalbicans* pode se ligar à outros epítomos.

Os resultados da FIGURA 20 sugerem que o *H. rubrisubalbicans* não se liga nas mesmas lectinas de raiz de milho que o *H. seropedicae*.

## 5.8 A PRODUÇÃO DE BIOFILME, EM MATRIZ INERTE, DO MUTANTE *wecB* É MENOR QUE A PRODUÇÃO DE BIOFILME DA ESTIRPE SELVAGEM M1

Para avaliar se o LPS de *H. rubrisubalbicans* está envolvido na formação de agregados celulares altamente organizados que são chamados de biofilme, as estirpes mutantes e selvagem foram cultivadas na presença de lâ de vidro, usado como matriz inerte. A capacidade de formação de biofilme foi determinada por coloração das bactérias aderidas a lâ de vidro. A FIGURA 21 mostra que somente a estirpe mutante *wecB*- produziu menos biofilme que a estirpe M1, as demais

estirpes mutantes de *H. rubrisubalbicans* não apresentaram diminuição, sugerindo que modificações na estrutura do LPS causadas pela falta de atividade da enzima WecB podem alterar a capacidade deste microrganismo em formar o biofilme.

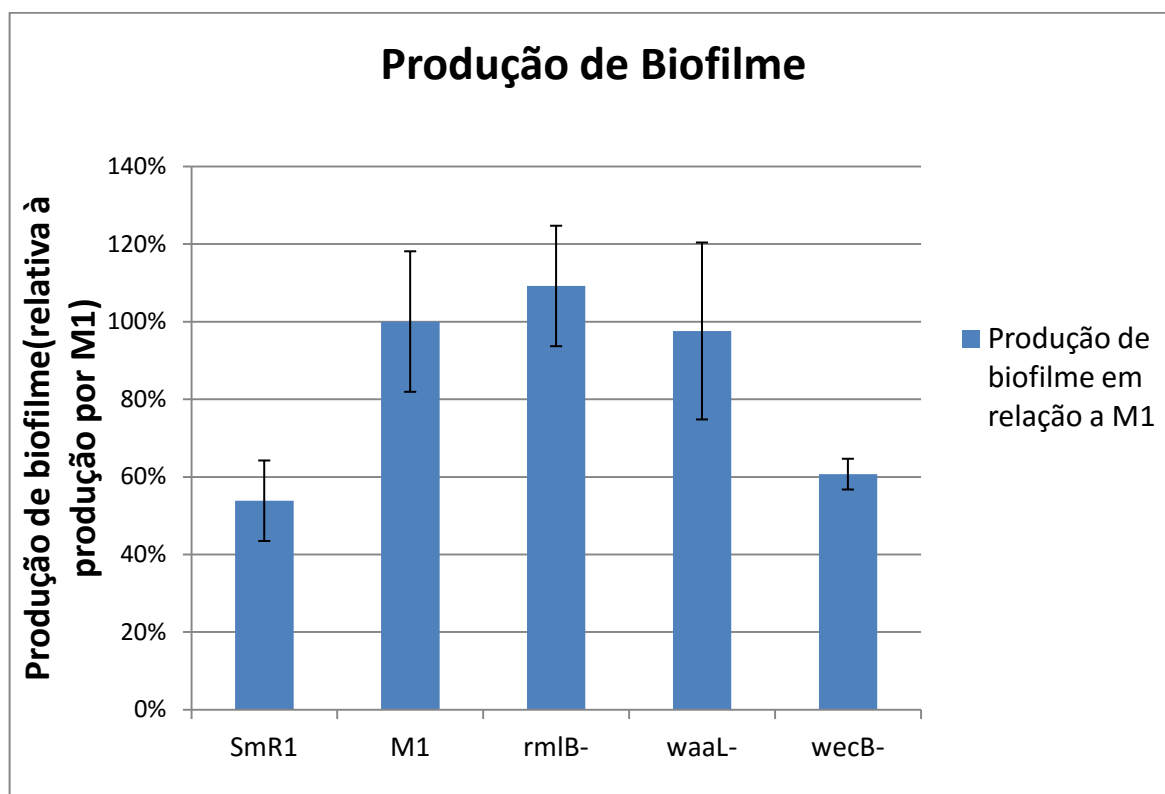


FIGURA 21: PRODUÇÃO RELATIVA DE BIOFILME. Observado através da técnica da aderência em lâ de vidro. O eixo das ordenadas representa a absorbância em d.o 550 em relação a leitura do controle, no caso *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em três triplicatas em 3 dias diferentes. A produção de biofilme se mostrou alterada na estirpe wecB-. Uma das hipóteses para a fitopatogenicidade de *H. rubrisubalbicans* é de que a produção de biofilme poderia interromper o aporte de nutrientes, bloqueando o fluxo de seiva, *H. seropedicae* não produz quantidades suficientes de biofilme para interromper o fluxo e seiva, dessa forma não gera doença.

O mutante wecB- apresentou diversos fenótipos onde foi menos capaz que as demais estirpes em competir ou suportar o aparecimento súbito de agente estressante, isso pode ser explicado pela ausência da enzima wecB, responsável pela conversão de N-acetilglicosamina a N-acetilmanosamina, levando a deficiência na produção de diversos glicocônjugados que deveriam ser exportados pela células, como por exemplo, o biofilme bacteriano e estruturas que dependam do ácido siálico para executar sua função (ALLARD *et al.*, 2001). As alterações causadas pela deficiência nesta enzima podem levar à fragilidade osmótica e perda da estrutura.

## 5.9 ENVOLVIMENTO DO LPS NA FORMAÇÃO DA ESTRIA VERMELHA EM ESTIRPES SUCEPTIVEIS DE SORGO

*H. rubrisubalbicans* é um fitopatógeno leve quando em associação a variedades susceptíveis de sorgo e cana de açúcar, podendo diminuir a vida útil e produtividade da planta devido a perda da área de fotossíntese (OLIVARES *et al.*, 1997).

As estirpes de *H. rubrisubalbicans* foram inoculadas em sorgo para avaliar o envolvimento da molécula de LPS no desenvolvimento da doença da estria vermelha em variedade suscetível de sorgo (FIGURA 22).

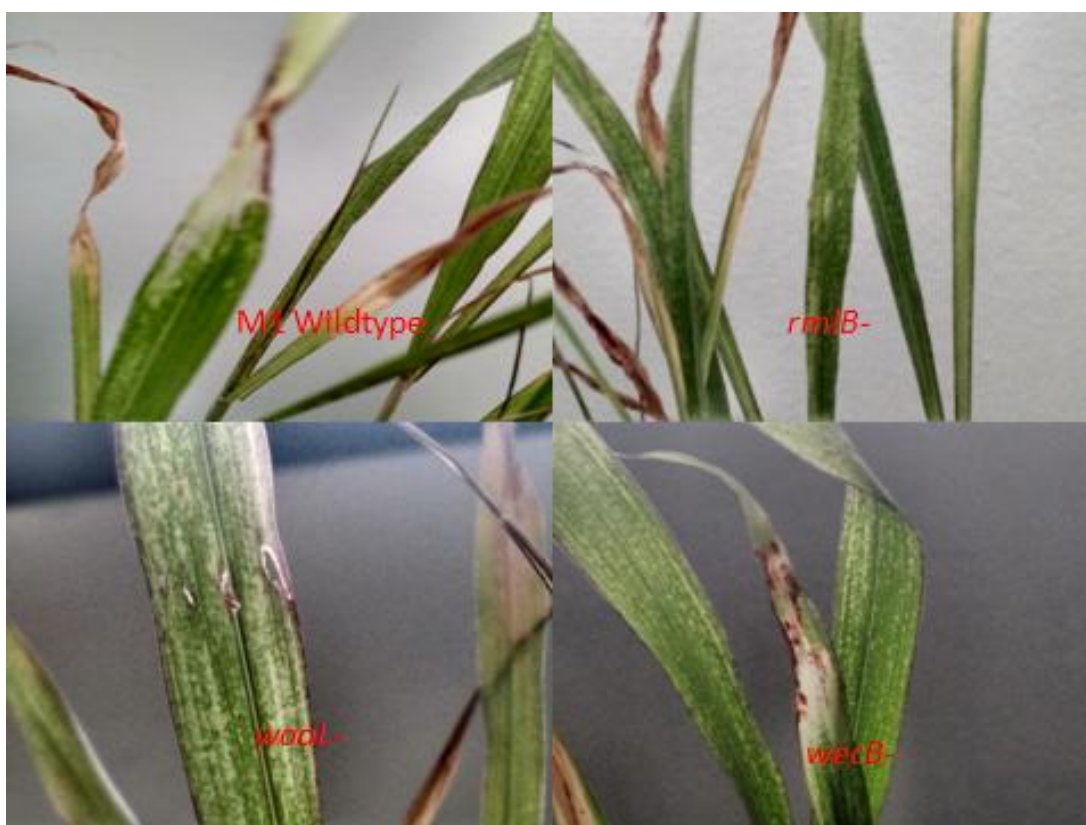


FIGURA 22: FORMAÇÃO DA DOENÇA DA ESTRIA VERMELHA EM ESTIRPE SUCEPTIVEL DE SORGO (*Sorghum bicolor*). Foto representa lesão necrótica das folhas no dia 7 após inoculação de  $10^5$  células, através da perfuração do colmo da planta. Experimento feito em 3 replicatas por um período de 21 dias. O sinal da doença da estria vermelha pode surgir como uma mancha vermelha no centro da folha desenvolvendo a clorose no local e abaulamento da região, claramente demonstrado na estirpe m1 e *wecB*-, também pode se mostrar como o surgimento de furos com aparência necrosada, observados nas estirpes *rmlB*- e *waaL*-.As características mostradas acima podem ser um indicativo de que as estirpes *rmlB*- e *waaL*- levaram a uma atenuação da doença em sorgo.



É possível observar que todas as estirpes de *H. rubrisubalbicans* foram capazes de desenvolver a doença da estria vermelha em sorgo, porém com algumas diferenças sutis.

Em algumas bactérias patogênicas para vegetais, como *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a deficiência na produção de EPS levou a alteração na apresentação da doença (QUINONES *et al.*, 2005). Mesmo possuindo alterações na molécula de LPS todas as estirpes mutantes foram capazes de gerar sinais característicos da doença assim como a estirpe parental, esses resultados sugerem que a molécula integral de LPS não é necessária para o desenvolvimento da doença.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi mostrado que a mutação nos genes *rmlB*, *waaL* e *wecB* alteram a biossíntese do LPS em *H. rubrisubalbicans*. A mutação nesses genes não é um fator essencial para a etapa de adesão com a raiz, porém se mostrou importante na colonização epifítica, principalmente nos mutantes *waaL*- e *wecB*-, que foram capazes de se aderir às raízes de milho na mesma proporção que a estirpe selvagem M1, no entanto foram deslocadas na colonização epifítica, característica marcante principalmente na ausência do O-antígeno (mutante *waaL*-), onde até mesmo *H. seropedicae*, uma bactéria pouco competitiva, passou a deslocar o mutante na colonização epifítica. Os experimentos de competição com *H. seropedicae* e com seu LPS purificado em excesso mostram que *H. rubrisubalbicans* não se liga a mesma lectina da raiz do milho que o *H. seropedicae*. Quanto ao estresse ambiental, a ausência do O-antígeno (mutante *waaL*-) e a diminuição na produção de biofilme (*wecB*-) levaram a susceptibilidade ao SDS, um agente desnaturante, e a modificação do O-antígeno (*rmlB*- e *waaL*-) levou a sensibilidade ao ácido salicílico em concentrações endógenas da planta, um metabólito secundário aumentado em resposta predatória. Esses resultados mostram que a estrutura íntegra do LPS é importante para a competição interespecífica da rizosfera, permitindo uma colonização eficiente e também na resposta ambiental no aparecimento súbito de agentes químicos, como o SDS e o ácido salicílico. O LPS parece não estar envolvido diretamente no caráter fitopatogênico do *H. rubrisubalbicans*, uma vez que os mutantes foram capazes de desenvolver a doença da estria vermelha em cultivar susceptível de sorgo, porém mutações no O-antígeno (*rmlB*- e *waaL*-) pode retardar a geração dos sinais da doença.

A próxima etapa deste projeto consta na caracterização química da molécula de LPS de *H. rubrisubalbicans* M1, M4 e dos mutantes construídos neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ÅGREN, G. I.; WETTERSTEDT, M. J. Å; BILLBERGER, M. F. K. Nutrient limitation on terrestrial plant growth – modeling the interaction between nitrogen and phosphorus. **New Phytologist**, p. 953–960, V. 194, e. 4, 2012.
- ALLARD, S. T.; GIRAUD, M. F. & NAISMITH. J. H. Epimerases: structure, function and mechanism. **Cell Mol Life Sci.** V.58(11), pp.1650-65. 2001
- BAJERSKI, F.; GANZERT, L.; MANGELSDORF, K. LIPSKI, A.; JURGEN, H.; PADUR, L. & WAGNER, D. *Herbaspirillum psychrotolerans* sp. nov., a member of the family Oxalobacteraceae from a glacier forefield. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 63, pp.3197–3203, 2013.
- BALDANI *et al.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986a.
- BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A. B.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant Soil** V.90, pp.35-40, 1986b.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov., and classification of a group of clinical isolates (EFgroup 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.46, p.802–810, 1996.
- BALDANI, V. L. D; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biol Fertil Soils**. V 30, pp 485–491, 2000.
- BALSANELLI, E., SERRATO, R. V., BAURA, V. A., SASSAKI, G., YATES, M. G., UN RIGO, L., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A.; *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology** . V.12(8), pp. 2233–2244, 2010.

BALSANELLI, E.; SASSAKI, G. L.; CARLSON, R. W.; MUSZYNSKI, A.; SERRATO, R. V.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. & IACOMINI, M. Structural analysis of *Herbaspirillum seropedicae* lipid-A and of two mutants defective to colonize maize roots. **Int J Biol Macromol.** V. 51(4), pp.384-91, 2012.

BALSANELLI, E., SERRATO, R.V., PEDROSA, F.O., SOUZA, E.M., MONTEIRO, R.A. Role of *Herbaspirillum seropedicae* LPS in plant colonization, in **Biological Nitrogen Fixation (ed F. J. de Bruijn)**, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9781119053095.ch93, 2013.

BALSANELLI, E.; TULESKI, T.; BAURA, V. YATES, M. G.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. & MONTEIRO, R. A.. Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides. **PLoS One**, V. 8(10), E. 77001, 2013b.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R. & HERNANDEZ, J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil.** V. 378, pp. 1–33, 2014.

BASTIÁN, F. *et al.* Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **plant growth regulation**, v.24, n.1, p.7-11, 1998.

BOGINO, P. C.; OLIVA, M. M.; SORROCHE, F. G. & GIORDANO, W. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. **Int J Mol Sci.** V. 14(8), pp. 15838–15859, 2013.

CARRO, L.; RIVAS, R.; LEON-BARRIOS, M.; GONZA´LEZ-TIRANTE, M.; VELA´ZQUEZ, E. & VALVERDE, A. *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., isolated from volcanic mountain soil, and emended description of the genus *Herbaspirillum*. **Int J Syst Evol Microbiol.** V.62, pp.1300–1306, 2012.

CHIANG S. L. & MEKALANOS J. J. *rfb* mutations in *Vibrio cholerae* do not affect surface production of toxin-coregulated pili but still inhibit intestinal colonization. **Infect. Immun.** V.67, pp. 976–980, 1999.

CHUNG, C.T.; NIEMELA, S.L. & MILLER, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **PNAS**. Vol. 86, pp. 2172-2175, 1989.

COLEMAN, W. G. & LEIVE, L. Two mutations which affect the barrier function of the *Escherichia coli* K-12 outer membrane. **J. Bacteriol.** V.139, pp.899–910, 1979.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Appl Environ Microbiol.** V.67, pp.2375-2379, 2001

DING, L. & YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial isolates isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.** V.54, pp.2223–2230, 2004.

DOBRITSA *et al.* Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **international journal of systematic and evolutionary microbiology**. V. 60, 2010.

DOWER, W. J., Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation. **Genetic Engineering, Principles and Methods**. V. 12, pp. 275-296, 1990.

ERRIDGE, C.; BENNET-GUERRERO, E.; POXTON, I.R. Structure and function of lipopolisaccharides. **Microb. Infect.** V.4, pp. 837-851, 2002.

ERICSSON, T. Growth and shoot: root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. **Plant and Soil**, p.168-169: v. 205-214, 1995.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiology**. v.58, p.352–386, 1994.

GIRAUD, M. & NAISMITH, J. H. The rhamnose pathway. **Current Opinion in Structural Biology**. 2000, V.10, E.6, pg. 687, 2000.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M. & LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, V154, pp 131–145, 2002.

HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **J. circular Agricultural Experiment Station**, V. 147(2), pp. 32, 1950.

IM, W.-T.; BAE, H.-S.; YOKOTA, A. & LEE, S. T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**. V.54, pp.851–855, 2004.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 48, No. 308, pp. 785-797, 1997.

JIANG, T.; LEI, W.; DAN, L.; YUE, L. I.; BASTIN, D. A.; YUNQI, G. & LU, F. Molecular analysis of *Shigella boydii* O1 O-antigen gene cluster and its PCR typing, **Canadian Journal of Microbiology**. V.51, E.5, pp.387, 2005.

JUNG, S. Y.; MI-HWA, L.; TAE-KWANG, O. & JUNG, H. Y. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 57, pp. 2284–2288, 2007.

KANNENBERG, E.L.; REUHS, B.L.; FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structure, biosynthesis and functions. In: The Rhizobiaceae. Ed. H.P. SPAINK; A. KONDOROSI; P.J.J. HOOYKAAS. Dordrecht:Kluwer Academic Publisher, pp. 154, 1998.

KIM, E. J.; JONES, M. B.; RHEE, J. K.; SAMPATHKUMAR, S. G. & YAREMA, K. J. Establishment of N-acetylmannosamine (ManNAc) analogue-resistant cell lines as improved hosts for sialic acid engineering applications. **Biotechnol Prog**. V.20, E.6, pp.1674-82, 2004.

KIRCHHOFF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. & HARTMANN, A.. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Int J Syst Evol Microbiol**. V.51, pp.157–168, 2001.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S. & RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. **Can J Microbiol.** V.43, pp.841-846, 1997.

KRAUSE *et al.* Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus sp.* strain BH72. **Natural Biotechnology.** V.24, p.1385–1391, 2008.

McPHERSON, D. F.; MANNING, P. A.; MORONA, G. Characterization of the dtdp-rhamnose biosynthetic genes encoded in the *rfb* locus of *Shigella flexneri*. **MOLECULAR MICROBIOLOGY.** V.11,E.2, PP. 281–292, 1994.

MEIER-DIETER, U.; BARR, K.; STARMAN, R.; HATCH, L. & RICK, P. D. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli rfe* gene involved in the synthesis of enterobacterial common antigen. Molecular cloning of the *rfe-rff* gene cluster. **J Biol Chem.** V.15, E.267, pp.746-53, 1992.

MONTEIRO, R. A., BALSANELLI, E.; TULESKI, T. R.; FAORO, H.; CRUZ, L. M.; WASSEM, R.; BAURA, V. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; WEISS, V.; DAROCHA, W. D.; MULLER-SANTOS, M.; CHUBATSU, L. S.; HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O. AND SOUZA, E. M. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by Suppressive Subtractive Hybridization and partial genome sequencing. **FEMS Microbiology Ecology.** V. 80(2), pp. 441-51, 2012.

MORRISON, D.C. & LEIVE, L. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 prepared by two extraction procedures. **J Biol Chem.** V. 250(8), pp.:2911-19, 1975.

MUELLER-LOENNIS, S.; LINDNER, B.; BRADE, H. Structural Analysis of Oligosaccharides from Lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* K12 Strain W3100 Reveals a Link between Inner and Outer Core LPS Biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry,** v.278, p.34090-34101, 2003.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V.M. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol Fertil Soils.** v.21, p.197–200, 1996.

OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, V.135, 1997.

OLIVARES F. L.; JAMES E. K.; BALDANI J. I, DOBEREINER J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytol.* vol.135, p. 723-737, 1997.

PEDROSA, F. O, MONTEIRO, R. A., WASSEM, R., CRUZ, L. M., AYUB, R. A., COLAUTO, N. B., FERNANDEZ, M. A., FUNGARO, M. H. P., GRISARD, E.C., HUNGRIA, M., MADEIRA, H. M. F., NODARI, R. O., OSAKU, C. A.; PETZLERLER, M. L.; TERENCEIO, H.; VIEIRA, L. G. E., STEFFENS, M. B. R., WEISS, V. A., PEREIRA, L.F. P., ALMEIDA, M.I. M., ALVES, L. A., MARIN, A. M., ARAUJO, L. M.; BALSANELLI, E., BAURA, V., A.; CHUBATSU, L.; FAORO, H.; FAVETTI, A.; FRIEDERMANN, G., GLIENKE, C.; KARP, S.; KAVACORDEIRO, V.; RAITTZ, R. T.; RAMOS, H. J. A.; RIBEIRO, E. M. S. F.; RIGO, L. U.; ROCHA, S. N., SCHWAB, S.; SILVA, S. G.; SOUZA, E. M.; TADRA-SFEIR, M. Z.; TORRES, R. A.; DABUL, A. N. G.; SOARES, M.A.M.; GASQUES, L. S.; GIMENES, C.C.T.; VALLE, J.; CIFERRI, R. R.; CORREA, L.C.; MURACE, N.K.; PAMPHILE, J. A.; PATUSSI, E. V.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A.; ROCHA, C.L.M.S.C.; ARANTES, O. M.N.; FURLANETO, M.C.; GODOY, L. P.; OLIVEIRA, C.E.C.; SATORI, D.; VILAS-BOAS, L.A.; WATANABE, M. A. E.; DAMBROS, B. P.; GUERRA, M. P.; MATHIONI, S. M.; SANTOS, K. L.; STEINDEL, M.; VERNAL, J.; BARCELLOS, F. G.; CAMPO, R.J.; CHUEIR, L. M. O.; NICOLA´S, M. F.; PEREIRA-FERRARI, L.; SILVA, J. L.C.; GIOPPO, N. M. R.; MARGARIDO, V. P.; MENCK-SOARES, M. A.; PINTO, F. G.S.; SIMAˆO, R. C. G.; TAKAHASHI, E. K.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M.; Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **PLoS Genetics**. V. 7, 2011.

PEÑUELAS, J. & SARDANS, J. The Role of Plants in the Effects of Global Change on Nutrient Availability and Stoichiometry in the Plant-Soil System. **Plant Physiology**, Vol. 160, pp. 1741–1761, 2012.

PIMENTEL et al. 1991a. Diversification of biological control strategies in agriculture. **Crop Protection**. v.10, p.243-253. 1991.

POSTGATE, J.R. The fundamental of nitrogen fixation. Cambridge university press, 1982.



QUINONES, B.; DULLA, G.; LINDOW, S.E. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** V. 18, pp. 682–93, 2005.

RAETZ, C. R. & WHITEFILD, C. Lipopolyssacharide endotoxins. **Annu Rev Biochem.** V. 71, pp. 635-700, 2002.

RAHIN, R.; BURROWS, L. L.; MONTEIRO, M. A. Perry, M. B. & LAM, J. S. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* (2000), 146, 2803–2814, 2000.

RASKIN, I.; TURNER, I. M. & MELANDER, W. R. Regulation of heat production in the inflorescences of an Arum lily by endogenous salicylic acid. **Proc. Nati. Acad. Sci.** V. 86, pp. 2214-2218, 1989.

RONCATO-MACCARI, L. D. B., RAMOS, H. J.O., PEDROSA, F. O., ALQUINI, Y., CHUBATSU, L. S., YATES, M.G., RIGO, L.U., STEFFENS, M.B., SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology ecology**, V. 45, pp. 37-47, 2003.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S. & HARTMANN, A. (2006). *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **Int J Syst Evol Microbiol.** V.56, pp.1341–1348, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning; a laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F; NICKELMAN, S & COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS.** V. 74, E.12, pp. 5463–5467, 1977.

SCHMID, M. Chapter 3.1.6: The Genus *Herbaspirillum*. In: SCHMID,; M. BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. prokaryotes, p.141-150, 2006.

SMITH, A. R. W.; MUNRO, S. M. R. & HIGNETT, R. C. T. Effect on lipopolysaccharide structure of aeration during growth of a plum isolate of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. **Microbiology**, V.140, pp.1585-1593, 1994.

SERRATO, R.V. Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, Curitiba, p. 143, 2008.

STEWART, W.M; DIBB, D.W; JOHNSTON, A. E e SMYTH, T.J. The Contribution of Commercial Fertilizer Nutrients to Food Production. **American Society of Agronomy journal**. Vol. 97 No. 1, p. 1-6, 2005.

TSAI, C., AND FRISCH, C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**; 119: 115–119; 1982.

TULESLI, T. R. envolvimento dos genes de biossíntese de celulose na formação de biofilme pela bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. 99f Dissertação de mestra do ciencias (bioquímica) - setor de ciencias biologicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A. & IGUAL, J.-M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Int J Syst Evol Microbiol**. V.53, pp.1979–1983, 2003.

WEI, L.; YI, X.; MCNEIL, M. R. & YUFANG, M. A. *rmIB* and *rmIC* genes are essential for growth of *mycobacteria*., **Biochemical and Biophysical Research Communications**,V. 342, E.1,pp. 170, 2006.

WILLIAMS, A. H.; IMMORMINO, R. M.; GEWIRTH, D. T. & RAETZ, C. R. Structure of UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase with a bound antibacterial pentadecapeptide. **Proc Natl Acad Sci**. V.18, E.103(29), pp.10877-82, 2006.

YAMASHITA, Y.; TOMIHISA, K.; NAKANO, Y.; SHIMAZAKI, Y.; OHO, T. & KOGA, T. Recombination between *gtfB* and *gtfC* is required for survival of a dTDP-rhamnose synthesis-deficient mutant of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose. **Infect Immun**. Vol.67, pp.3693-3697, 1999.

RIETSCHER, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F. U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZÄHRINGER, U.; SEYDEL, U. D. I. & PADOVA, F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J.** V. 8(2), PP.:217-25, 1994.

WEGER, L. A.; BAKKER, P. A. H. M.; SCHIPPERS, B.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. & LUGTENBERG, B. J. J. *Pseudomonas* spp. with mutational changes in the O-antigenic side chain of their lipopolysaccharide are affected in their ability to colonize potato roots. **Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions.** V. 36, pp.197- 202, 1989.

ZHANG *et al.* Genetic organization and sequence of the gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3: similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of Salmonella and to the bacterial polysaccharide transport systems. **Molecular biology.** V. 9, E. 2, pp.309-321, 1993.

## ANEXOS

### Meio LB (Luria-Bertani):

Dissolver 10g triptona, 5g extrato de levedura 10g de cloreto de sódio. Água deionizada q.s.p 1000mL. Para a forma sólida, ou LA, adicionar 1% de agarose ao sistema antes de autoclavar.

### Meio Nfb-malato e suplementos de fosfato e fonte de nitrogênio:

#### Para o meio Nfb-Malato:

Substância	concentração (g/L)
Sulfato de magnésio	0.2
Cloreto de sódio	0.1
Cloreto de calcio	0.02
Acido nitrilo acético	0.056
sulfato ferroso	0.02
biotina	0.0001
molibdato de sódio	1
sulfato de manganês	1.175
acido bromidrico	1.4
sulfato cuproso	0.04
sulfato de zinco	0.12
Malato de sódio	5

A agarose será 1,5% para o meio sólido e , 15% para o meio semi-sólido.

A suplementação de nitrogênio é feita adicionando até 20mM de cloreto de amônia ao meio de cultura no momento do cultivo. para o fosfato, No momento do inóculo são adicionados 50 mM de tampão fosfatos ( $K_2HPO_4$  17,8 g/L;  $KH_2PO_4$  159,5 g/L),

## ANEXO 3: Curvas em SDS

